



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Pesquisa de assinaturas de seleção de malária na região do  
gene humano *TPI* (triosefosfato isomerase)**

**Mónica Susana Costa Guerra**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM PARASITOLOGIA MÉDICA**

**OUTUBRO, 2012**



## **Pesquisa de assinaturas de seleção de malária na região do gene humano *TPI* (triosefosfato isomerase)**

**Mónica Susana Costa Guerra**

Licenciada em Ciências Biomédicas pela Universidade do Algarve

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Parasitologia Médica, realizada sob orientação científica da Investigadora Doutora Ana Paula Arez

**Orientadora:** Investigadora Doutora Ana Paula Arez  
Centro de Malária e outras Doenças Tropicais (CMDT)  
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Co-Orientador:** Doutor Licínio Manco  
Centro de Investigação em Antropologia e Saúde (CIAS)  
Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade de Coimbra

**OUTUBRO, 2012**

*Aos meus pais e irmã ...*

# AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer a toda a direção e docência do XI Mestrado em Parasitologia Médica, pela excelência como conduziram estes dois anos, tanto a nível profissional como pessoal. Um agradecimento especial ao Professor Doutor Paulo Almeida por toda a dedicação prestada e, à Professora Doutora Lénea Campino pelo entusiasmo que demonstra nas suas aulas, o que indiretamente deliberou a minha escolha pela área da Parasitologia.

Agradeço à Investigadora Doutora Ana Paula Arez por ter aceitado orientar-me neste trabalho e por toda a dedicação, motivação, valiosos comentários e correções cruciais na elaboração desta dissertação.

Agradeço ao Doutor Licínio Manco a coorientação desta dissertação, bem como toda a disponibilidade, apoio, acompanhamento, espírito crítico e entusiasmo pela temática abordada nesta tese, traduzindo-se em importantes contribuições neste trabalho.

Um agradecimento ternurento à equipa das “Mixinfect”, em especial à Cristina Mendes e à Patrícia Machado por toda a amizade, paciência, dedicação, ajuda e aconselhamento ao longo deste último ano.

Um agradecimento especial a todos os meus colegas e amigos de mestrado, Ana Filipa Teixeira, Vasco Gordicho, Mário da Costa, Lis Coelho, Isa Pires, Arlete Troco Miguel Landum, Idalécia Moiane e Ana Sousa pela grande cumplicidade e amizade tanto nos momentos de “glória” como nos de desânimo. Com vocês vivi bons momentos da minha vida, obrigada por tudo o que partilhamos. Agradeço em especial à Ana Filipa Teixeira, que me tem acompanhado ao longo destes 5 anos. Obrigada por toda a amizade.

Agradeço à Raquel Santos pela sua amabilidade, disponibilidade e acolhimento na cidade de Coimbra.

Aos meus primos e companheiros de casa João Monteiro, Patrícia Guerra e Liliana Guerra principalmente por me “aturarem” todos os dias, obrigada pela vossa dedicação e grande motivação constante.

Por último, mas em primeiro lugar no meu coração, aos meus amados pais Fernando e Fátima pelo enorme exemplo que são para mim, por todos os sacrifícios que

têm feito, por aquele abraço inexplicável que me recarrega “as baterias” todos os fins-de-semana. Espero um dia conseguir ser como vocês e transmitir todo o amor que me têm dedicado. Agradeço carinhosamente “à minha menina”, a minha irmã Mariana, por existir na minha vida.

**Um muito obrigada!**

# RESUMO

## **Pesquisa de assinaturas de seleção de malária na região do gene humano *TPI* (triosefosfato isomerase)**

**Mónica Susana Costa Guerra**

**PALAVRAS-CHAVE:** Malária, população Africana, Triosefosfato isomerase (TPI), variantes do promotor do gene *TPI*, mutação, infecção, evolução humana, metabolismo eritrocitário

A malária continua a ser a maior causa de doença e mortalidade no Mundo, sobretudo no continente Africano. Das cinco espécies do parasita causador de malária em humanos, *Plasmodium falciparum* é a mais letal.

Em termos evolutivos a malária é um fenómeno recente com cerca de 10 000 anos, período onde tem atuado como importante pressão seletiva no genoma humano, contribuindo para a seleção de inúmeros polimorfismos que propiciam maior resistência ao protozoário parasita. Apesar da interação entre o parasita e o hospedeiro ser foco de inúmeros estudos, é bastante complexa e ainda está longe de ser totalmente compreendida, nomeadamente os fatores de suscetibilidade/resistência à infecção ou à doença.

Este estudo teve como principal objetivo contribuir para o estudo dos polimorfismos eritrocitários associados à proteção contra a infecção malárica grave, centrando-se no gene *TPI* que codifica uma enzima glicolítica.

Foi selecionada uma amostra populacional Africana (Moçambique) agrupada de acordo com a gravidade da doença (grupos clínicos). Fez-se o rastreio dos exões do gene *TPI* por SSCP, na busca de alterações no padrão de migração dos produtos amplificados, indiciadores de alterações na sequência nucleotídica que pudessem ser assinaturas de eventuais efeitos evolutivos exercidos pela malária; caracterizaram-se as variantes do promotor do gene *TPI*: -5A>G, -8G>A e -24T>G; e analisou-se o polimorfismo intrónico 2262 situado no intrão 5.

Esta análise permitiu identificar o polimorfismo -8G>A como possível marcador associado à proteção contra a malária, observando-se diferenças estatisticamente significativas entre doentes com malária grave e não-grave [ $P = 0,032$ ; OR = 0,230 (CI<sub>95%</sub>: 0,049-1,081)], quando associado ao haplótipo -5G/-8A/2262G. Através de um estudo de microssatélites nas regiões adjacentes ao gene *TPI*, estimou-se a antiguidade dos polimorfismos -5G>A e -8G>A, tendo-se obtido a idade de ~20 mil anos e ~14 mil anos, respetivamente. Ao nível bioquímico, o polimorfismo -8G>A poderá estar associado à acumulação celular de metilglioxal citotóxico, um potente inibidor da proliferação parasitária.

# ABSTRACT

## Looking for selection signatures of malaria in the human *TPI* (triosephosphate isomerase) gene region

Mónica Susana Costa Guerra

**KEYWORDS:** Malaria, African population, Triosephosphate isomerase (TPI), *TPI* gene promoter variants, mutation, infection, human evolution, erythrocyte metabolism

Malaria remains a world major cause of morbidity and mortality, especially in Africa. There are five parasite species that cause malaria in humans, being *Plasmodium falciparum* the most lethal.

In evolutionary terms, malaria is a recent phenomenon with about 10 000 years, a period over which it has acted as an important selective force on the human genome, contributing to the selection of several polymorphisms that confer greater resistance to the protozoan parasite. Although parasite/host interaction has been intensely studied, it is extremely complex and is far from being totally understood, particularly the factors of susceptibility / resistance to infection.

This study aimed to contribute for the knowledge of erythrocyte polymorphisms associated with protection against severe malarial infection, focusing on the *TPI* gene that encodes a glycolytic enzyme.

An African population sample (Mozambique) was grouped according to the severity of disease (clinical groups). A screening of the exons of the *TPI* gene by SSCP was performed to search for migration alteration patterns of amplified products suggestive of changes in nucleotide sequence which could be signatures of possible evolutive effects exerted by malaria; *TPI* gene promoter variants -5A>G, -8G>A and -24T>G were characterized; and an intragenic polymorphic marker 2262 within intron 5 was studied.

This analysis allowed identifying a polymorphism -8G>A as a possible marker associated with protection against severe malaria, as showed by the significant differences between patients with severe and non-severe malarial infection [P = 0,032; OR = 0,230 (CI95%: 0,049-1,081)]. This polymorphism was associated with the haplotype -5G/-8A/2262G. The age of -5G>A and -8G>A polymorphisms was estimated, through a study of microsatellites in adjacent regions of the *TPI* gene, corresponding to the age of ~20 000 years and ~14 000 years, respectively. Biochemically, -8G>A polymorphism may be associated with cellular accumulation of cytotoxic methylglyoxal, a potent inhibitor of parasite proliferation.

# ABREVIATURAS

<b>AGEs</b>	Produtos avançados de glicação
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de prata
<b>Ass</b>	Infeção malárica assintomática
<b>ATN1</b>	Proteína atrofina 1
<b>ATP</b>	Adenosina-trifosfato
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>CEIHT</b>	Conselho de Ética do IHT
<b>CPE</b>	<i>Cap proximal element</i>
<b>CR</b>	<i>Erythrocyte – complement receptor</i>
<b>CS</b>	Proteínas circum-esporozoíticas
<b>DHA</b>	Dihidroxiacetona não fosforilada
<b>DHAP</b>	Fosfato de dihidroxiacetona
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTP</b>	3' - deoxinucleósido - 5' - trifosfatos
<b>DRPLA</b>	<i>Atrofia dentatorubral-pallidoluisian</i>
<b>EBA</b>	<i>Erythrocyte-binding antigen</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EIR</b>	Taxa de inoculação entomológica
<b>G</b>	Infeção malárica grave
<b>G3P</b>	Gliceraldeído-3-fosfato
<b>G3PD</b>	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
<b>G6PD</b>	Glucose-6-fosfato-desidrogenase
<b>g.l.</b>	Graus de liberdade
<b>GSH</b>	Glutathione
<b>H<sub>0</sub></b>	Hipótese nula
<b>H<sub>1</sub></b>	Hipótese alternativa
<b>Hb</b>	Hemoglobina



<b>HBF</b>	Hemoglobina fetal
<b>He</b>	Heterozigotia esperada
<b>HK</b>	Hexocinase
<b>Ho</b>	Heterozigotia observada
<b>HWE</b>	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração necessária para atingir 50% de inibição
<b>IC<sub>95%</sub></b>	Intervalo de confiança a 95%
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IHMT</b>	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>MG</b>	Metilglioxal
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
<b>NG</b>	Infeção malárica não-grave
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b><i>P.</i></b>	<i>Plasmodium</i>
<b><i>P</i></b>	Probabilidade ( <i>P</i> -value)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PCR-RFLP</b>	PCR - <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>PCR-SSCP</b>	PCR- <i>Single-Strand Conformational Polymorphism</i>
<b>PfAQP</b>	Aquagliceroporina de <i>P. falciparum</i>
<b>PfEMP</b>	<i>P. falciparum Erythrocyte Membrane Protein</i>
<b>PFK</b>	Fosfofrutocinase
<b>PfGAPDH</b>	Enzima GAPDH de <i>P. falciparum</i>
<b>PGI</b>	Fosfoglicose isomerase
<b>PGK</b>	Fosfoglicerato cinase
<b>PGM</b>	Fosfoglicerato mutase
<b>PK</b>	Piruvato cinase

<b>PNCM</b>	Programa Nacional de Controlo da Malária
<b>PTP</b>	Família das tirosinas fosfatases
<b>PTPN6</b>	Proteína-tirosina fosfatase, não recetora tipo 6
<b>SDS</b>	Sódio dodecil sulfato
<b>SNPs</b>	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
<b>STRs</b>	<i>Short tandem repeats</i> ou microssatélites
<b>TBE</b>	Tampão constituído por Tris, ácido bórico e EDTA
<b>TE</b>	Tampão constituído por Tris e EDTA
<b>TPI</b>	Triosefosfato isomerase
<b>TRAP</b>	Trombospondina
<b>UV</b>	Ultravioleta

#### **Ácidos Nucleicos:**

<b>A</b>	Adenina
<b>C</b>	Citosina
<b>G</b>	Guanina
<b>T</b>	Timina
<b>R</b>	Purina (A ou G)

#### **Aminoácidos:**

<b>Ala</b>	Alanina
<b>Arg</b>	Arginina
<b>Asp</b>	Aspargina
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>Glu</b>	Glutamato
<b>Gly</b>	Glicina
<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>Leu</b>	Leucina
<b>Lys</b>	Lisina
<b>Met</b>	Metionina
<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>Val</b>	Valina

# ÍNDICE GERAL

<i>Agradecimentos</i> .....	iii
<i>Resumo</i> .....	v
<i>Abstract</i> .....	vi
<i>Abreviaturas</i> .....	vii
<i>Índice geral</i> .....	x
<i>Índice de figuras</i> .....	xiv
<i>Índice de tabelas</i> .....	xvi
<b>I - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Malária</b> .....	<b>2</b>
1.1 Contextualização .....	2
1.2 Definição .....	2
1.3 Agente etiológico .....	2
1.3.1 Ciclo biológico do parasita <i>Plasmodium</i> sp. ....	3
1.4 Epidemiologia .....	8
1.4.1 Distribuição geográfica .....	8
1.4.2 Características que influenciam a transmissão e patogénese da malária .....	9
1.4.2.1 Resistência à malária .....	9
1.4.3 Classificação da malária .....	11
1.5 Aspectos clínicos e patogénese .....	11
1.5.1 Quadro clínico .....	11
1.5.1.1 Infecção malárica assintomática (Ass) .....	14
1.5.1.2 Infecção malárica não – grave (NG) .....	15

1.5.1.3 Infecção malárica grave (G) .....	15
1.6 Fatores do hospedeiro associados à suscetibilidade / resistência à infecção .....	15
1.6.1 Enzimopatias eritrocitárias .....	17
1.6.1.1 Glucose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PD) .....	18
1.6.1.2 Piruvato Cinase (PK) .....	20
<b>2. Triosefosfato isomerase (TPI) .....</b>	<b>22</b>
2.1 Gene .....	22
2.2 Enzima .....	23
2.3 Deficiência em TPI .....	23
2.3.1 Elevada incidência de heterozigóticos em Afroamericanos .....	25
2.3.2 Associação com a malária.....	26
<b>3. Objetivos e Justificação .....</b>	<b>27</b>
 <b>II - MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	 <b>29</b>
<b>1. Área de estudo.....</b>	<b>30</b>
<b>2. Amostras Biológicas.....</b>	<b>30</b>
2.1 Colheita e armazenamento das amostras .....	31
2.2 Extração de DNA.....	31
2.3 Aspectos éticos .....	32
<b>3. Técnicas moleculares .....</b>	<b>33</b>
3.1 Análise dos polimorfismos -5, -8 e -24 do promotor da TPI.....	33
3.1.1 PCR-RFLP ( <i>PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ).....	33
3.1.1.1 Reação de PCR .....	33
3.1.1.2 Reação de restrição enzimática.....	34
3.2 Análise da mutação Glu104Asp .....	35
3.2.1 PCR-RFLP .....	35

3.2.1.1 Reação de PCR .....	35
3.2.2.2 Reação de restrição enzimática.....	35
3.3 Rastreio de todos exões do gene <i>TPI</i> por PCR-SSCP (PCR- <i>Single-Strand Conformational Polymorphism</i> ) .....	37
3.3.1 Reação de PCR .....	37
3.3.2 SSCP .....	38
3.3.3 Coloração do gel com nitrato de prata .....	39
3.4 Análise dos microssatélites (CTTTT) <sub>n</sub> , (CAG) <sub>n</sub> e (CTA) <sub>n</sub> .....	40
3.4.1 Reação de PCR .....	40
3.5 Sequenciação de DNA .....	41
3.6 Estimar a antiguidade das mutações -8G>A e -5G>A.....	42
<b>4. Análise estatística.....</b>	<b>43</b>
 <b>III - RESULTADOS .....</b>	 <b>46</b>
<b>1. SNPs do gene <i>TPI</i>.....</b>	<b>47</b>
1.1 Polimorfismos da região promotora .....	47
1.2 Análise da mutação Glu104Asp .....	48
1.3 Rastreio dos exões do gene <i>TPI</i> por PCR - SSCP .....	49
1.4 Polimorfismo intrónico 2262 .....	50
1.5 Análise estatística .....	51
1.5.1 Testes de associação .....	51
1.5.2 Desequilíbrio de <i>linkage</i> .....	53
<b>2. Microssatélites.....</b>	<b>53</b>
2.1 Repetição pentanucleotídica (CTTTT) <sub>n</sub> .....	54
2.2 Repetição trinucleotídica (CAG) <sub>n</sub> .....	54
2.3 Repetição trinucleotídica (CTA) <sub>n</sub> .....	55
2.4 Desequilíbrio de <i>linkage</i> entre os SNPs e microssatélites .....	56

3. Datação dos polimorfismos -5 e -8 do promotor do gene <i>TPI</i> .....	57
IV - DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	60
V - CONCLUSÃO.....	72
VI - BIBLIOGRAFIA .....	74

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I.1:</b> Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i> sp. ....	7
<b>Figura I.2:</b> Países e territórios afetados pela malária, 2010 .....	8
<b>Figura I.3:</b> Representação gráfica da relação entre a idade do paciente, suscetibilidade à infecção, produção de anticorpos contra diferentes estádios parasitários e letalidade da infecção.....	10
<b>Figura I.4:</b> Metabolismo da glucose no eritrócito .....	17
<b>Figura III.1:</b> Identificação das variantes do promotor -5, -8 e -24 por restrição enzimática .....	48
<b>Figura III.2:</b> Exemplo dos fragmentos obtidos da restrição enzimática com a endonuclease DdeI para a identificação da mutação Glu104Asp no exão 3 do gene <i>TPI</i> . .....	49
<b>Figura III.3:</b> Exemplo dos fragmentos obtidos do rastreio ao exão 3 do gene <i>TPI</i> por PCR-SSCP .....	49
<b>Figura III.4:</b> Exemplo dos fragmentos obtidos do rastreio ao exão 7 do gene <i>TPI</i> por PCR-SSCP .....	50
<b>Figura III.5:</b> Parte da sequência genética do exão 7 do gene <i>TPI</i> do indivíduo heterozigótico para a mutação rs12692 (G>A).....	50
<b>Figura III.6:</b> Exemplo dos fragmentos obtidos do rastreio à fração correspondente entre os exões 5 e 6, do gene <i>TPI</i> por PCR-SSCP .....	50
<b>Figura III.7:</b> Caracterização da mutação rs12692 (G>A), presente no intrão 5 do gene <i>TPI</i> .....	51
<b>Figura IV.1:</b> Hipóteses extrapoladas para o surgimento do haplótipo -5A-8A na região promotora do gene <i>TPI</i> : mutações recorrentes <i>versus</i> recombinação genética, com base nas frequências de cada haplótipo na população em estudo. ....	66

<b>FiguraVI.2:</b> Formação, reatividade e destoxificação do metilglioxal em eritrócitos parasitados. ....	69
--	----



# ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela I.1:</b> Características das espécies de <i>Plasmodium</i> sp. causadoras de malária em humanos .....	3
<b>Tabela I.2:</b> Fatores que influenciam o quadro clínico observado na infecção malárica ...	9
<b>Tabela I.3:</b> Classificação de endemicidade .....	12
<b>Tabela I.4:</b> Polimorfismos eritrocitários associados à proteção contra a infecção malárica grave.....	16
<b>Tabela I.5:</b> Classes da deficiência em G6PD.....	19
<b>Tabela I.6:</b> Polimorfismos descritos no gene <i>TPI</i> .....	24
<b>Tabela II.1:</b> Mistura de reação para amplificação da região promotora do gene <i>TPI</i> ...	33
<b>Tabela II.2:</b> Condições de amplificação da região promotora do gene <i>TPI</i> .....	34
<b>Tabela II.3:</b> Composição da mistura de reação para a restrição enzimática com TseI e MscI .....	34
<b>Tabela II.4:</b> Composição da mistura de reação para a restrição enzimática com SfcI ..	35
<b>Tabela II.5:</b> Condições da digestão enzimática das enzimas TseI, MscI e SfcI e respectivos tamanhos dos fragmentos esperados.....	35
<b>Tabela II.6:</b> Mistura de reação para amplificação da região contendo a mutação Glu104Asp do gene <i>TPI</i> .....	36
<b>Tabela II.7:</b> Condições de amplificação da região contendo a mutação Glu104Asp do gene <i>TPI</i> .....	36
<b>Tabela II.8:</b> Composição da mistura de reação para a restrição enzimática com DdeI.	36
<b>Tabela II.9:</b> Condições da digestão enzimática da enzima DdeI, e respectivos tamanhos dos fragmentos esperados .....	37

<b>Tabela II.10:</b> Oligonucleótidos específicos usados para a amplificação dos vários fragmentos do gene <i>TPI</i> , tamanho dos fragmentos amplificados e temperatura de hibridação no PCR.....	38
<b>Tabela II.11:</b> Mistura de reação para amplificação dos fragmentos específicos do gene <i>TPI</i> .....	39
<b>Tabela II.12:</b> Condição da eletroforese da reação de SSCP, consoante o fragmento a analisar .....	39
<b>Tabela II.13:</b> Características dos STRs em estudo.....	40
<b>Tabela II.14:</b> Oligonucleótidos específicos para cada STR e respectivas temperaturas de hibridização.....	41
<b>Tabela II.15:</b> Condições da reação de PCR, utilizando o kit Multiplex PCR Qiagen...	41
<b>Tabela II.16:</b> Exemplo de uma tabela 2×2 usada no cálculo do <i>odds ratio</i> . ....	45
<b>Tabela III.1:</b> Características dos SNPs analisados neste estudo presentes no gene <i>TPI</i> .....	47
<b>Tabela III.2:</b> Distribuição genotípica das variantes do promotor da <i>TPI</i> na amostra total e nos vários grupos clínicos de malária .....	48
<b>Tabela III.3:</b> Frequências alélicas dos SNPs em estudo no gene <i>TPI</i> em doentes de malária .....	52
<b>Tabela III.4:</b> Frequências haplotípicas entre os SNPs em estudo no gene <i>TPI</i> em doentes de malária .....	53
<b>Tabela III.5:</b> Desequilíbrio de <i>linkage</i> entre os SNPs estudados nos diferentes grupos clínicos de malária .....	53
<b>Tabela III.6:</b> Haplótipos, gerados pela associação do microssatélite (CTTTT) <sub>n</sub> e os polimorfismos -5 e -8 da região promotora do gene <i>TPI</i> e respectivas frequências absolutas.....	54
<b>Tabela III.7:</b> Haplótipos, gerados pela associação do microssatélite (CAG) <sub>n</sub> e os polimorfismos -5 e -8 da região promotora do gene <i>TPI</i> e respectivas frequências absolutas.....	55

<b>Tabela III.8:</b> Haplótipos, gerados pela associação do microssatélite (CTA) <sub>n</sub> e os polimorfismos -5 e -8 da região promotora do gene <i>TPI</i> e respectivas frequências absolutas.....	56
<b>Tabela III.9:</b> Desequilíbrio de <i>linkage</i> entre SNPs e STRs nos diferentes grupos clínicos de malária .....	57
<b>Tabela III.10:</b> Estudo da diversidade genética de cada microssatélite através do valor de equilíbrio de Hardy-Weinberg e respectivos valores de heterozigotia observada e esperada .....	57
<b>Tabela III.11:</b> Antiguidade estimada para os polimorfismos -5 e -8 (nos <i>backgrounds</i> -5A-8G e -5G-8G) e respectivos desvios-padrão, com base na variação acumulada para cada microssatélite (CTTTT) <sub>n</sub> e (CAG) <sub>n</sub> , e a média entre estas idades calculadas em gerações e anos. Foi considerado o valor de 25 anos por geração.....	58

# **I - INTRODUÇÃO**

---

## 1. Malária

### 1.1 Contextualização

Também conhecida como paludismo, esta patologia já remonta à era pré-Cristã, tendo sido primeiramente citada por Hipócrates que descreveu alguns sintomas. No entanto, foi somente no início do século XIX que o termo malária teve origem.

A malária tem sido a doença infecciosa com maior impacto na história mundial, pois, com exceção da tuberculose, a malária mata mais do que qualquer outra doença transmissível no Mundo. Segundo o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2011), que reúne dados de 106 países onde a malária é endêmica (99 países ou áreas onde ocorre transmissão de malária e 7 países que se encontram na fase de prevenção da reintrodução), em 2010 foram estimados 216 milhões de casos em todo o Mundo, dos quais 655 000 resultaram em óbitos, principalmente no continente Africano (91%), seguindo-se o sudoeste Asiático (6%) e a região do Mediterrâneo Oriental (3%), afetando sobretudo crianças com idade inferior a 5 anos (86%).

### 1.2 Definição

A malária é uma parasitose causada por protozoários unicelulares do género *Plasmodium*, transmitidos por fêmeas do mosquito *Anopheles* sp.. É caracterizada por um quadro febril de padrão paroxístico e intermitente, cujo desenvolvimento em humanos depende da espécie do parasita e estirpe infetante, da idade, do estado imunitário, e da constituição genética e nutricional do indivíduo afetado (Mendis, *et al.*, 2001; Neves, *et al.*, 2005).

### 1.3 Agente etiológico

Os parasitas causadores de malária pertencem ao Filo Apicomplexa, Classe Haematozoa, Ordem Haemosporida, Família Plasmodiidae e Género *Plasmodium* (Chiodini, *et al.*, 2001).

Durante cerca de 80 anos apenas quatro espécies de *Plasmodium* foram consideradas capazes de infetar humanos: *Plasmodium falciparum* (Welch, 1898), *Plasmodium vivax* (Grassi e Filetti, 1889), *Plasmodium ovale* (Stephens, 1922) e *Plasmodium malariae* (Laveran, 1881). Porém, recentemente foi reconhecida uma quinta espécie causadora de malária nos humanos, *Plasmodium knowlesi* (Sinton e

Mulligan, 1933), que era anteriormente associada principalmente à infecção em macacos (Kantele, *et al.*, 2011 e Dhangadamajhi, *et al.*, 2010).

Cada espécie apresenta uma distribuição geográfica e patogénese singular (**Tabela I.1**), sendo as espécies *P. falciparum* e, numa dimensão muito menor, *P. vivax* (Mendis, *et al.*, 2001) as principais responsáveis pelos casos de doença e de morte por malária.

**Tabela I.1: Características das espécies de *Plasmodium* sp. causadoras de malária em humanos** (adaptado de Kantele, *et al.*, 2011).

Características	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>	<i>Plasmodium vivax</i>	<i>Plasmodium ovale</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<b>Distribuição, incidência na área endémica (%)</b>	Global, mais comum no continente Africano (80-90)	Malásia e zonas adjacentes (1-60)	Maioritariamente na Ásia (50-80)	Continente Africano (5-8)	Global (0,5-3)
<b>Parasitémia</b>	Pode ser elevada	Pode ser elevada	< 2%	< 2%	< 2%
<b>Risco de vida</b>	Sim	Sim	Sim	Não	Não
<b>Ciclo de febre (dias)</b>	2	1	2	2	3
<b>Infecta eritrócitos</b>	Todos	Todos	Reticulócitos	Reticulócitos	Eritrócitos maduros
<b>Hipnozoítos no fígado</b>	Não	Provavelmente não	Sim	Sim	Não

### 1.3.1 Ciclo biológico do parasita *Plasmodium* sp.

Biologicamente, as espécies de *Plasmodium* sp. são similares, apresentando no seu ciclo biológico duas fases: assexual ou esquizogónica e sexual ou esporogónica (**Figura I.1**). A fase assexual desenvolve-se em humanos, primeiro no fígado (fase exo-eritrocitária) e depois nos eritrócitos circulantes (fase eritrocitária). A fase sexual ocorre no mosquito (Despommier, *et al.*, 2005 e Neves, *et al.*, 2005).

## **Hospedeiro vertebrado – Humano**

### **Fase exo-eritrocitária**

A infecção inicia-se durante uma refeição sanguínea de fêmeas de *Anopheles* infetadas em humano, inoculando desta forma esporozoítos infetantes (cerca de 15 a 200 por refeição sanguínea) que atingem a circulação sanguínea em poucos minutos. Desprovidos de cílios ou flagelos, os esporozoítos movimentam-se até ao fígado, através da reorientação de proteínas à superfície do parasita, nomeadamente as proteínas circum-esporozoíticas (CS) e a proteína adesiva relacionada com a trombospondina (TRAP), essenciais para a invasão das células hospedeiras. Após invadir o hepatócito, os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos pré-eritrocitários que se vão multiplicar por reprodução assexuada do tipo esquizogónica, originando esquizontes teciduais e posteriormente milhares de merozoítos que invadirão os eritrócitos (Despommier, *et al.*, 2005 e Neves, *et al.*, 2005).

A maturação nos hepatócitos requer 5 a 7 dias para *P. falciparum*, e cada esporozoíto produz cerca de 40 000 merozoítos. Para *P. vivax*, estes valores são 6 a 8 dias e 10 000 merozoítos; para *P. ovale*, 9 dias e 15 000 merozoítos; e para *P. malariae*, 12 a 16 dias e 2000 merozoítos. Nas infeções por *P. vivax* e *P. ovale*, o mosquito vetor inocula também populações geneticamente distintas de esporozoítos (Despommier, *et al.*, 2005), que não iniciam imediatamente o seu desenvolvimento exo-eritrocítico no fígado e permanecem em estado de latência no hepatócito, sendo por isso denominadas hipnozoítos (do grego *hypnos*, sono) (Neves, *et al.*, 2005). O fenómeno de reincidência ou relapso de certas malárias, após períodos variáveis de incubação, é devido à esquizogonia tardia dos hipnozoítos no interior dos hepatócitos, podendo estes permanecer quiescentes no fígado por um período de aproximadamente 5 anos. (Despommier, *et al.*, 2005 e Neves, *et al.*, 2005).

As espécies *P. falciparum* e *P. malariae* não desenvolvem hipnozoítos, como tal não apresentam reincidências. No entanto, *P. falciparum* pode recrudescer por 1 a 2 anos através da continuação da fase eritrocítica, cujos períodos permanecem subclínicos e assintomáticos; para *P. malariae* este período pode estender-se por 30 anos ou mais (Despommier, *et al.*, 2005 e Neves, *et al.*, 2005).

### **Fase eritrocitária**

Quando os merozoítos são libertados dos esquizontes hepáticos, chegam à corrente sanguínea, invadem os eritrócitos e iniciam a fase eritrocitária da infecção.

A interação dos merozoítos com o eritrócito envolve uma sequência complexa de acontecimentos que começa no reconhecimento de recetores específicos presentes na membrana eritrocitária. Para *P. falciparum*, o principal recetor são as glicoforinas e para *P. vivax*, a glicoproteína do grupo sanguíneo Duffy. Além disso, *P. vivax* invade apenas reticulócitos, enquanto *P. falciparum* invade hemácias de todas as idades. Já *P. malariae* invade preferencialmente hemácias maduras. Estas características têm implicações diretas sobre as parasitémias verificadas nas infeções causadas pelas diferentes espécies de plasmódios (**Tabela I.1**).

Uma vez no interior da célula, o parasita começa por se diferenciar. Primeiro, formando trofozoítos em forma de anel (trofozoítos jovens) e, posteriormente, trofozoítos maduros. Seguidamente, o desenvolvimento intra-eritrocítico do parasita ocorre por esquizogonia, formando esquizontes compostos de merozoítos. Este estadio termina na rutura dos eritrócitos e consequente libertação de merozoítos para a corrente sanguínea, que invadirão novos eritrócitos.

A fase eritrocitária do ciclo do *Plasmodium* é tipicamente síncrona e periódica. As espécies *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* completam o processo de invasão do eritrócito por merozoítos até à sua rutura, a cada 48 horas, observando-se uma periodicidade “terça”. *Plasmodium malariae* produz uma malária “quartã”, que requer 72 horas para completar o seu ciclo, e *P. knowlesi* parece apresentar uma periodicidade diária (Dhangadamajhi, *et al.*, 2010).

Nem todos os merozoítos são submetidos à divisão assexual, porquanto, depois de algumas gerações, ocorre a diferenciação em estadios sexuais, os gametócitos, que prosseguem o seu desenvolvimento no mosquito vetor (Despommier, *et al.*, 2005 e Neves, *et al.*, 2005).

### **Hospedeiro invertebrado – Mosquito**

Durante a refeição sanguínea, a fêmea *Anopheles* ingere as formas sanguíneas do parasita, mas somente os gametócitos são capazes de evoluir no inseto, iniciando o ciclo esporogónico. É no intestino médio do mosquito que o parasita encontra as condições

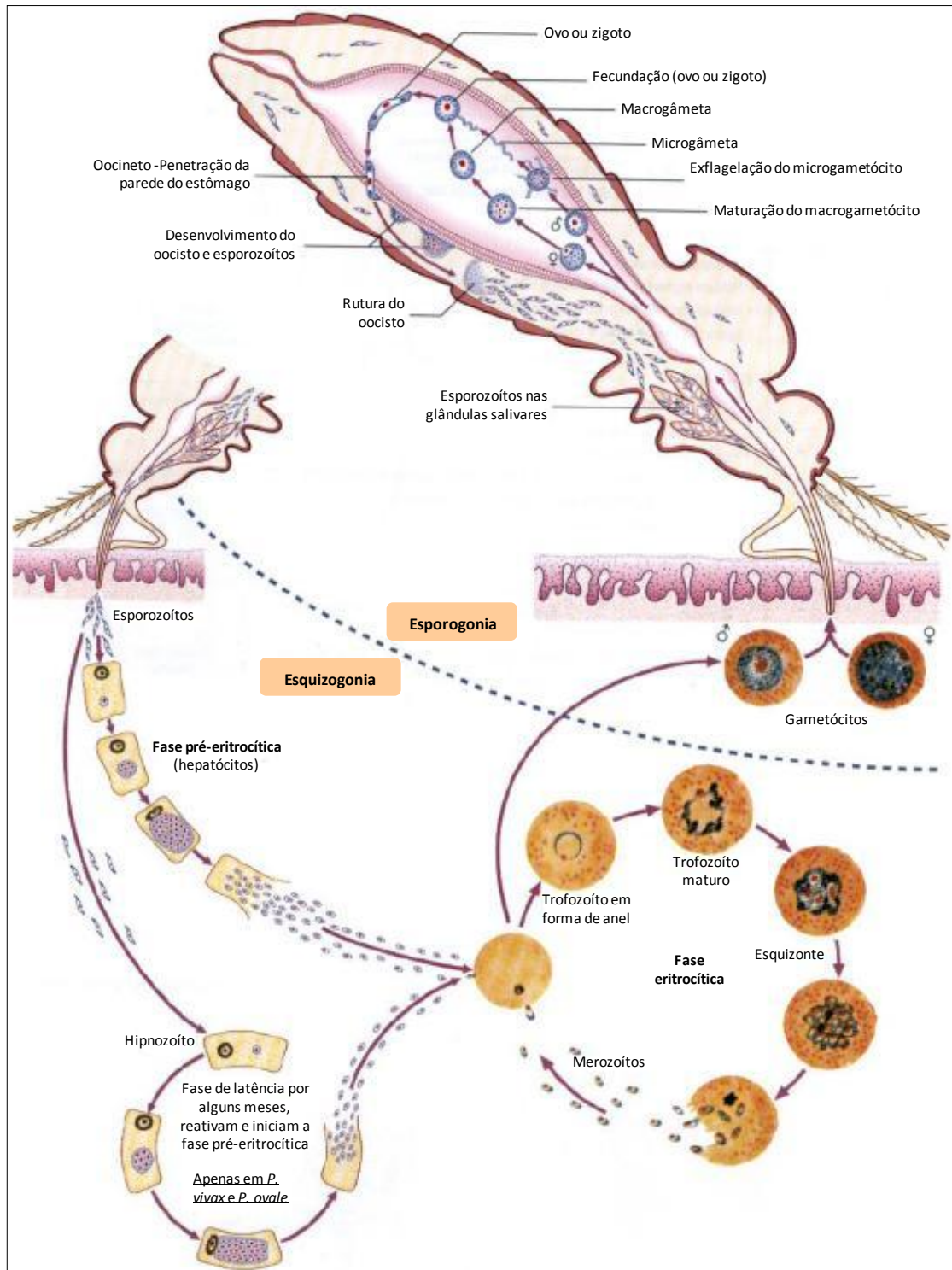


necessárias à gametogénese, onde o gametócito feminino origina um macrogâmeta e o gametócito masculino, por exflagelação, dá origem a oito microgâmetas, em que cada um deles pode eventualmente fertilizar um macrogâmeta, formando o ovo ou zigoto (forma diplóide). Após a fecundação, este sofre meiose e diferenciação, originando um oocineto móvel, que invade a parede do intestino médio até à camada epitelial, onde enquista formando o oocisto. Inicia-se o processo de divisão esporogónica, formando esporozoítos, que após alguns dias provocam a rutura da parede do oocisto, sendo disseminados por todo o corpo do inseto através da hemolinfa até atingir as glândulas salivares. Desta forma, quando o mosquito fêmea efetua uma nova refeição sanguínea, juntamente com a saliva serão injetados, no novo hospedeiro, esporozoítos infetantes, iniciando um novo ciclo (Despommier, *et al.*, 2005 e Neves, *et al.*, 2005).

A transmissão natural da malária ao homem ocorre quando fêmeas de *Anopheles* infetadas, com esporozoítos nas suas glândulas salivares, efetuam uma refeição sanguínea capaz de inocular estas formas infetantes (ver secção I.1.3.1).

Na última década, tem merecido especial atenção a transmissão congénita / transmissão transplacentária, definida, segundo Uneke, (2011), pela presença de formas assexuadas do parasita em esfregaços sanguíneos do cordão umbilical obtido durante o parto, ou do sangue periférico do bebé nos primeiros sete dias de vida, independentemente do quadro clínico; uma vez que a gravidez está implicada na depressão da resposta imune, é um facto de risco substancial para a mãe, o feto e o recém-nascido. Estima-se que, na região subsariana de África, a malária afete 24 milhões de mulheres grávidas e por ano ocorram, na globalidade, 75 000 a 200 000 mil óbitos de crianças infetadas durante a gravidez.

A transmissão desta infeção, apesar de pouco frequente, também pode ocorrer acidentalmente, por transfusão sanguínea, transplantação, partilha de seringas contaminadas entre toxicod dependentes e em acidentes nosocomiais e laboratoriais (Despommier, *et al.*, 2005; Neves, *et al.*, 2005 e Bartoloni, *et al.*, 2012).



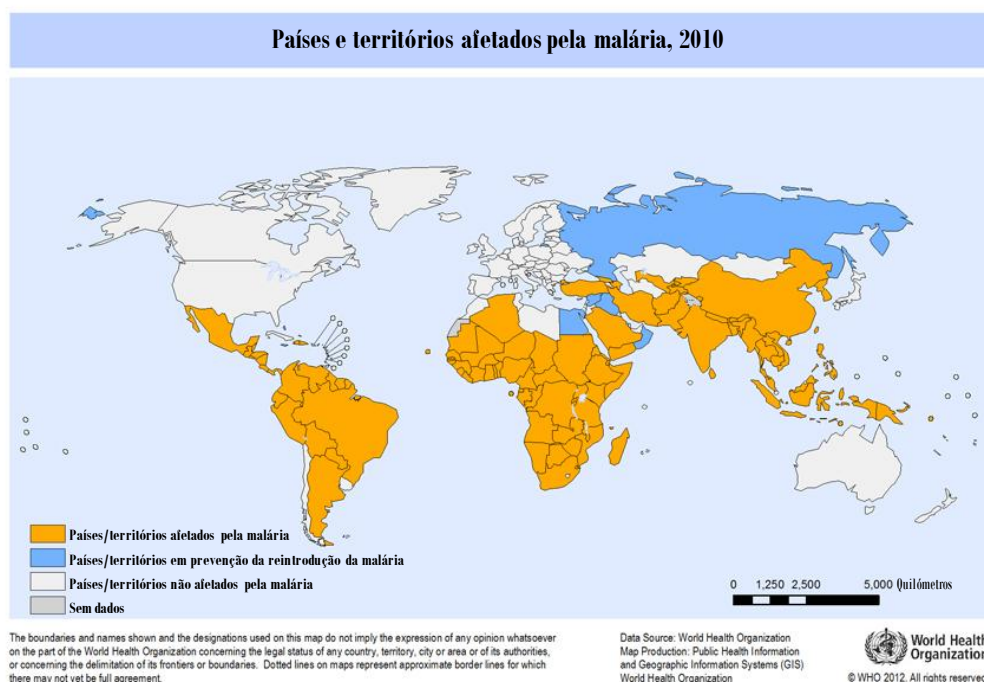
**Figura I.1: Ciclo de vida de *Plasmodium* sp.** (adaptado de Chiodini, *et al.*, 2001).

## 1.4 Epidemiologia

### 1.4.1 Distribuição geográfica

A malária é uma patologia difundida na maioria das regiões tropicais e subtropicais do Mundo, com altitudes inferiores a 2000m e temperaturas superiores a 16°C e inferiores a 33°C. Estes, entre outros fatores, condicionam a distribuição desigual da malária no Mundo, com diferentes incidências e, consequentemente, padrões epidemiológicos diversos, dependendo da região em estudo.

A população mundial em risco de contrair a doença, estimada em 2010 pela OMS (WHO, 2011), foi de 3,3 mil milhões de pessoas, sendo que a população residente na África subsariana apresentou um risco aumentado. Na Região Africana, delimitada pela OMS, foram registados 81% dos casos e 91% das mortes de malária, sendo as crianças menores de 5 anos de idade e as mulheres grávidas as mais afetadas, apresentando quadros clínicos mais severos (**Figura I.2**).



**Figura I.2: Países e territórios afetados pela malária, 2010 (WHO, 2012).**

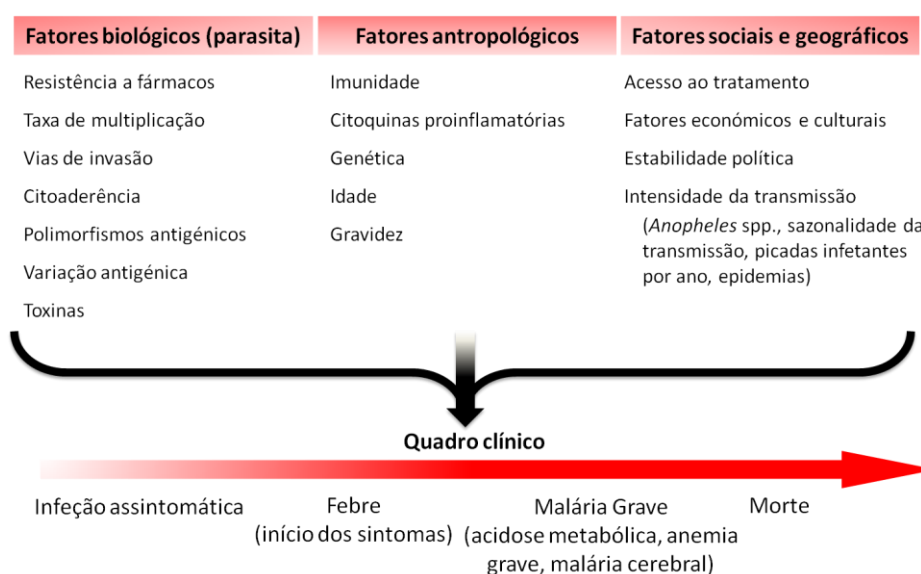
Para além do continente Africano apresentar um clima propício ao desenvolvimento do parasita e do vetor, esta região apresenta muitos outros fatores preponderantes que acentuam a incidência desta patologia, nomeadamente a distribuição geográfica das várias espécies de *Plasmodium* sp.: *P. falciparum* predomina

na África subsariana, no Haiti e na Nova Guiné; *P. vivax* prevalece na América Central e na Índia, e ambos, *P. vivax* e *P. falciparum*, apresentam prevalências semelhantes no Sudeste Asiático, na Oceânia e na América do Sul; fora do continente Africano raramente se observam casos de *P. ovale*; já *P. malariae* é encontrado praticamente em todas as áreas endêmicas, ainda que com prevalências muito inferiores às de *P. falciparum* e *P. vivax* (Scotto, G., 2010).

#### 1.4.2 Características que influenciam a transmissão e patogênese da malária

A transmissão da malária está dependente de uma dinâmica de fatores, nomeadamente ao nível biológico (ciclo de vida do parasita e vetor), antropológico, sociocultural e económico-político. A interação entre estes fatores, de forma natural ou condicionada pelo Homem, determina os níveis de risco para adquirir a infeção e, de certo modo, influenciam o desfecho clínico de cada paciente (**Tabela I.2**) (Miller, *et al.*, 2002).

**Tabela I.2: Fatores que influenciam o quadro clínico observado na infeção malárica** (adaptado de Miller, *et al.*, 2002).



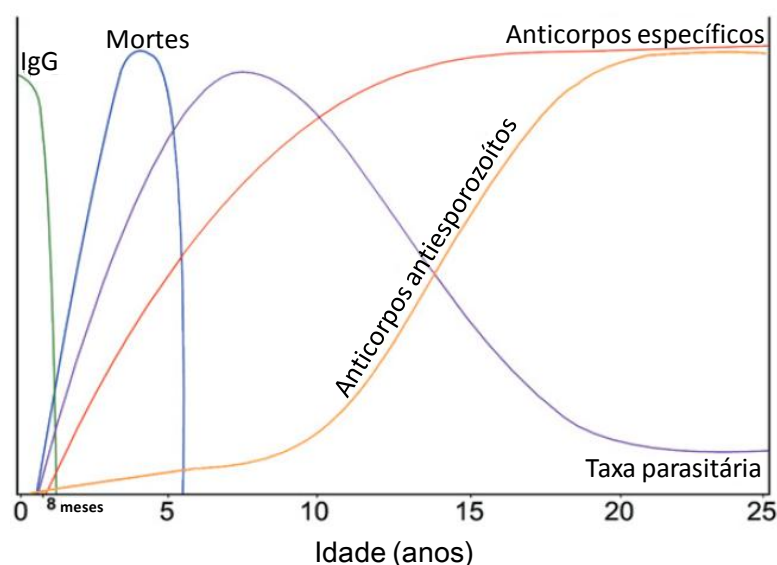
##### 1.4.2.1 Resistência à malária

A sobrevivência a uma infeção por *Plasmodium* sp., está fortemente dependente do tipo e do grau de resposta imune desencadeada pelo hospedeiro. Os mecanismos imunes envolvidos na proteção contra a malária podem ser divididos em duas categorias: resistência inata e resistência adquirida.

A resposta imune inata é uma característica inerente do hospedeiro e independente de qualquer contacto prévio com o parasita. Este tipo de resistência está associado a polimorfismos genéticos do hospedeiro que podem influenciar a sua suscetibilidade à malária. A ausência de recetores eritrocitários específicos, que impedem a interação dos merozoítos, é um exemplo de resposta imune inata.

A história natural da malária em regiões de elevada transmissão traduz a complexidade da resposta imunológica naturalmente adquirida pelo Homem contra *Plasmodium* sp. e a dinâmica relação parasita-hospedeiro que se desenvolve nos indivíduos constante e cronicamente expostos à doença.

Neste tipo de resistência, o número de inoculações experienciadas por um indivíduo e o intervalo de tempo entre as re-infeções são fatores determinantes na aquisição de um estado imune protetor contra a doença. Por conseguinte, são as crianças com menos de 5 anos de idade as mais vulneráveis à malária grave. No entanto, é descrito na literatura que os recém-nascidos durante os primeiros três meses de vida estão protegidos contra a infeção malárica grave. Esta característica pode dever-se à transferência passiva de anticorpos IgG da mãe imune para o filho, embora possam estar envolvidos também outros fatores, como a presença de eritrócitos com grandes quantidades de hemoglobina fetal (HbF), proporcionando um microambiente desfavorável ao desenvolvimento parasitário (**Figura I.3**) (Neves, *et al.*, 2005).



**Figura I.3: Representação gráfica da relação entre a idade do paciente, suscetibilidade à infeção, produção de anticorpos contra diferentes estadios parasitários e letalidade da infeção** (adaptado de Despommier, *et al.*, 2005).

Um outro fator responsável pela lenta aquisição de imunidade antiparasitária prende-se com a expressão à superfície do eritrócito, de diversas famílias de antígenos variantes, induzida pelo parasita como estratégia de evasão ao sistema imunológico, desencadeando diferentes e exacerbadas respostas imunes embora pouco protetoras.

Após a faixa etária de maior suscetibilidade à infecção e atingindo a idade adulta, a resistência adquirida pode atuar de diferentes formas: ao nível das manifestações clínicas, reduzindo o risco de morte ou apenas reduzindo a intensidade dos sintomas; ou em pontos cruciais do ciclo de vida do parasita no organismo, promovendo a sua destruição.

Nas regiões onde a malária não é endémica, os níveis de transmissão são baixos, a imunidade antiparasitária é lentamente adquirida e rapidamente perdida, após 6 meses a 1 ano sem reinfeções. Este intervalo é suficiente para que um indivíduo volte a estar vulnerável à doença (Carter, *et al.*, 2002).

O tipo de classificação da endemicidade da malária a que um indivíduo é exposto vai condicionar a resposta imunológica gerada e consequentemente o seu estado clínico (Despommier, *et al.*, 2005 e Carter, *et al.*, 2002).

#### **1.4.3 Classificação da malária**

A malária é classificada como endémica, numa área onde ocorra uma incidência constante de casos ao longo de vários anos consecutivos, e epidémica, quando ocorre agravamento súbito, ocasional ou periódico da incidência de casos.

O indicador da endemicidade da malária numa região pode ser definido com base no índice esplénico, estimado pela proporção de crianças dos 2 aos 9 anos com baço hipertrofiado ou de acordo com a taxa parasitária (proporção de infeções existentes numa população numa determinada altura), conforme apresentado na **Tabela I.3** (WHO, 2008 e Mendis, *et al.*, 2009).

### **1.5 Aspetos clínicos e patogénese**

#### **1.5.1 Quadro clínico**

A libertação de merozoítos, após a rutura dos esquizontes teciduais, para a corrente sanguínea induz o processo de patofisiologia da doença e o aparecimento de sintomas desencadeado pela ativação da cascata de citocinas (Neves, *et al.*, 2005).

**Tabela I.3: Classificação de endemicidade** (Índice Esplénico: medida obtida através da multiplicação entre os diâmetros longitudinal, transversal e ântero-posterior do baço) (adaptado de Mendis, *et al.*, 2009).

Características	Hipoendémica	Mesoendémica	Hiperendémica	Holoendémica
<b>Taxa parasitária/ Índice esplénico (faixa etária dos 2-9 anos)</b>	0-10%	11-50%	>50%	>75%
<b>Endemicidade</b>	Reduzida	Moderada	Elevada	Elevada
<b>Estabilidade da transmissão</b>	Instável		Estável	
<b>Epidemias</b>	Frequentes, dependendo da transmissão sazonal		Muito improvável	
<b>Imunidade</b>	População vulnerável ao parasita		É comum a aquisição de imunidade coletiva	
<b>EIR<sup>a</sup></b>	<0,25	0,25-10	11-140	>140

<sup>a</sup>Taxa de inoculação entomológica

O intervalo entre o início da infeção e o aparecimento de sintomas é denominado período de incubação. São vários os fatores que condicionam a durabilidade desta fase, tais como a espécie de *Plasmodium* sp., a via de transmissão, o estado imunitário do indivíduo (nível de resistência adquirida), a quimioprofilaxia e, provavelmente, a densidade parasitária inoculada (Despommier, *et al.*, 2005 e Bartoloni, *et al.*, 2012). Este período é de sensivelmente duas semanas para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale*, 18 a 40 dias para *P. malariae* e 9 a 12 dias para *P. knowlesi* (Bartoloni, *et al.*, 2012; Bronner, *et al.*, 2009 e Guide to Surveillance, Reporting and Control, 2006)

Os primeiros sintomas da infeção malárica, comuns às diferentes espécies de *Plasmodium* sp., são inespecíficos e, muitas vezes, confundidos com síndrome gripal. Os sintomas prodrómicos descritos são: mal-estar, anorexia, fadiga, tonturas, cefaleias, mialgias, náuseas, vômitos, entre outros que antecedem a manifestação de febre, sintoma característico da malária. A febre começa, geralmente, com um padrão irregular, a temperatura vai aumentando com sinais de tremores e calafrios. Após alguns dias, a febre tende a ser periódica dependendo do sincronismo do ciclo esquizogónico (Despommier, *et al.*, 2005; Neves, *et al.*, 2005 e Bartoloni, *et al.*, 2012).

Na infecção por *P. vivax* e *P. ovale*, o ciclo esquizogónico começa a ser sincrónico após 5 a 7 dias, causando periódicos paroxismos febris. O paroxismo clássico da malária apresenta três fases: calafrios, febre e exaustão. A primeira fase resulta do fenómeno de intensa vasoconstrição periférica, causando a sensação de frio extremo no doente durante 10 a 15 minutos. Logo após este período, a temperatura começa a aumentar gradualmente até atingir um pico de febre, geralmente, entre os 39 a 41°C, iniciando a fase febril que se mantém por um período de 2 a 6 horas. A última fase, com uma duração de 2 a 3 horas, é caracterizada pela defervescência da febre com sintomas de diaforese e fraqueza intensa (Despommier, *et al.*, 2005 e Neves, *et al.*, 2005).

O paroxismo febril completo, nas infeções por *P. vivax* e *P. ovale*, ocorre a cada três dias (malária terçã), consequência da periodicidade do ciclo esquizogónico a cada 48 horas. Quanto à infecção por *P. malariae*, esta apresenta um paroxismo febril tipicamente separado por 72 horas (malária quartã).

Numa infecção por *P. falciparum*, a febre tem início nos últimos dias do período de incubação (entre 9 a 14 dias). As crises febris podem ser, neste caso, intermitentes ou contínuas, não manifestando sinais de periodicidade até que a doença perdure por uma semana ou mais. Quando ocorre um paroxismo febril, pode ser diário, a cada três dias (malária terçã) ou com intervalos de 36 horas (malária subterçã). Os sintomas prodrómicos persistem e aumentam com a infecção, observando-se também anorexia e sintomas gastrointestinais. Também se observam sinais físicos não-específicos como hepatoesplenomegalia, hipotensão ortostática e indícios de icterícia (Bartoloni, *et al.*, 2012 e Carter, *et al.*, 2002).

Embora os ciclos evolutivos das espécies causadoras sejam similares, do ponto de vista patológico a infecção malárica apresenta diferenciações que podem determinar as variações na evolução clínica da doença. Em indivíduos não-imunes, a infecção por *P. falciparum* é a que geralmente apresenta formas mais graves da doença, caracterizada pelo acometimento e disfunção de vários órgãos e sistemas: nervoso central, hematopoiético, respiratório, circulatório, renal e disfunções hepáticas (Bartoloni, *et al.*, 2012 e Carter, *et al.*, 2002).

Assim, embora a febre seja um sintoma crucial da infecção, independentemente da espécie de *Plasmodium*, os sinais clínicos são diversos e apresentam diferentes graus



de gravidade, podendo variar entre uma leve cefaleia a severas complicações, levando à morte particularmente na infecção por *P. falciparum*. O diagnóstico precoce e um tratamento adequado são determinantes na prevenção da morbidade evitável e consequências fatais. A ausência de parâmetros clínicos específicos que permitam confirmar a infecção justifica a necessidade de métodos laboratoriais para o diagnóstico da malária (Bartoloni, *et al.*, 2012 e Neves, *et al.*, 2005).

#### **1.5.1.1 Infecção malárica assintomática (Ass)**

Segundo a OMS, é classificada como assintomática uma infecção malárica que apresente parasitemia confirmada laboratorialmente (no presente trabalho, resultado positivo após detecção por PCR) para qualquer espécie de *Plasmodium*, com ausência e sem história recente de febre e de outros sintomas indicadores de malária (WHO, 2007).

Apesar de ser elevada a quantidade de estudos sobre a gravidade clínica da doença, as infecções assintomáticas de malária não estão ainda bem compreendidas. O maior obstáculo no estudo destas infecções é a carência de um critério de diagnóstico padronizado. O diagnóstico destas infecções pode acontecer durante o período pré-sintomático da infecção, fase que antecede o aparecimento de parasitemia no sangue e de manifestações clínicas. Por outro lado, podem ocorrer também diagnósticos que não contemplam a história clínica do doente, tendo este apresentado sintomas durante um breve período de tempo, mas que posteriormente foram suprimidos, tanto os sintomas como a parasitemia, pela medicação prescrita. Estas duas situações comprometem um correto diagnóstico, que apenas é solucionado pela inclusão de outros critérios, observados em alguns estudos, como o acompanhamento longitudinal do doente, crucial para diferenciar infecções que aparentam ser assintomáticas durante a detecção, mas podem tornar-se sintomáticas posteriormente; e a quantificação parasitária, que também é necessária, pois cerca de  $\frac{2}{3}$  dos diagnósticos negativos por microscopia para esta infecção apresentam níveis sub-patentes de parasitemia diagnosticados por PCR (Bottius, *et al.*, 1996 e Laishram, *et al.*, 2012).

Estes métodos de diagnóstico envolvem uma logística complexa, tanto ao nível de recursos humanos como em termos monetários, o que os torna impraticáveis na maioria das regiões endêmicas para a malária. Paradoxalmente, o diagnóstico e o tratamento destas infecções são de extrema importância, pois têm sido referidas como um

grande obstáculo à eliminação da malária, uma vez que estes doentes são considerados reservatórios silenciosos.

#### **1.5.1.2 Infecção malárica não – grave (NG)**

Considera-se uma infecção não-grave quando o doente apresenta parasitémia (no presente trabalho, resultado positivo após deteção por PCR) para qualquer espécie de *Plasmodium*, febre (temperatura axilar  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ) e um nível de hemoglobina de  $\text{Hb} > 5 \text{ g/dL}$ .

#### **1.5.1.3 Infecção malárica grave (G)**

Os critérios que definem a malária-grave são: parasitémia para qualquer espécie de *Plasmodium* (no presente trabalho, resultado positivo após deteção por PCR), febre (temperatura axilar  $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ), o nível de hemoglobina de  $\text{Hb} \leq 5 \text{ g/dL}$  e/ou outros sintomas, tal como coma, prostração ou convulsões (WHO, 2000).

### **1.6 Fatores do hospedeiro associados à suscetibilidade / resistência à infecção**

Em termos evolutivos, a malária é um fenómeno recente com cerca de 10 000 anos, e os mecanismos que favorecem a sobrevivência de uns indivíduos e o desenvolvimento de infeções maláricas potencialmente letais noutros é uma questão que tem merecido importante relevância na investigação científica (Durand, *et al.*, 2008).

O grande impacto a nível mundial que a malária fomenta, nomeadamente em termos de morbilidade, e de mortalidade infantil, tem levado a comunidade científica a explorar a relação entre a proteção contra a malária ou os seus sintomas e as condições de hereditariedade. Esta associação evidenciou a malária como uma importante força seletiva no genoma humano, resultando na seleção natural de numerosos polimorfismos genéticos (**Tabela I.4**), como as hemoglobinopatias, as talassémias, o antigénio Duffy, o sistema ABO e as enzimopatias: deficiência em glucose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e a mais recentemente estudada, deficiência em piruvato cinase (PK). Estas variantes genéticas, em homozigotia, acarretam outras doenças, o que poderia desfavorecer a sua seleção na evolução humana, tendo sido esse efeito contrariado pela ação da malária, exercendo uma seleção positiva balanceadora (Durand, *et al.*, 2008, Min-Oo, *et al.*, 2005 e Dhangadamajhi, *et al.*, 2010).

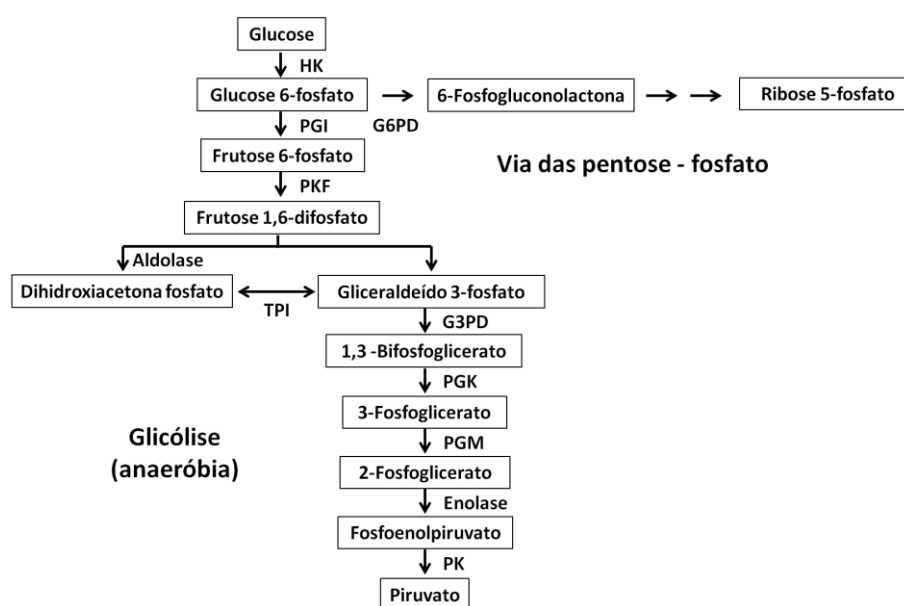
**Tabela I.4: Polimorfismos eritrocitários associados à proteção contra a infecção malárica grave** (adaptado de Dhangadamajhi, *et al.*, 2010).

Variantes genéticas	Mecanismos de proteção	Referências
<b>Proteínas membranares</b>		
Antigénio Duffy	Eritrócitos Duffy-negativos, inibem a junção apical impossibilitando a invasão de <i>P. vivax</i> e <i>P. knowlesi</i> .	Gero, <i>et al.</i> , (1994)
Deficiência em glicoforina C	Proteção contra a invasão parasitária. A glicoforina C medeia a ligação do ligando EBA-140 de <i>P. falciparum</i> ao eritrócito, sendo esta junção anulada pela deleção.	Maier, <i>et al.</i> , (2003) e Williams, (2006)
Proteína banda 3	Resistência à invasão do parasita. Aumenta a adesão dos ovalócitos (eritrócitos ovais) infetados por <i>P. falciparum</i> ao CD36, reduzindo assim a interação neurovascular dos eritrócitos infetados no cérebro.	Williams, (2006)
Proteínas CR	Nos eritrócitos deficientes em proteínas CR é reduzida a capacidade de <i>P. falciparum</i> na formação de rosetas.	Stoute, (2005)
Sistema ABO	Indivíduos do grupo sanguíneo O não apresentam a glicotransferase terminal, o que previne a formação de rosetas.	Fry, <i>et al.</i> , (2008)
<b>Enzimopatias</b>		
Deficiência em G6PD	Potencia a fagocitose dos eritrócitos infetados num estado precoce do desenvolvimento parasitário resultante dos danos oxidativos manifestados nas células deficientes em G6PD.	Cappellini, <i>et al.</i> , (2008)
Deficiência em PK	Reduz a taxa de replicação parasitária nos eritrócitos e promove a fagocitose.	Ayi, <i>et al.</i> , (2008)
<b>Hemoglobinopatias</b>		
HbS	Aumenta a deformidade dos eritrócitos parasitados e promove a remoção de células falciformes pelo baço. Reduz a invasão eritrocitária, potencia a fagocitose e inibe o crescimento parasitário em condições de hipóxia nos microvasos venosos. Alterações no ligando PfEMP-1 reduz a citoaderência dos eritrócitos parasitados. Desenvolve a imunidade inata e adquirida.	Cholera, <i>et al.</i> , (2008) e Wellems, <i>et al.</i> , (2009)
HbC	Alterações no ligando PfEMP-1 reduz a citoaderência dos eritrócitos parasitados.	Fairhurst, <i>et al.</i> (2005)
HbE	Uma anormalidade membranar não identificada torna os eritrócitos resistentes à invasão parasitária.	Olivieri, <i>et al.</i> , (2008)
$\alpha$ -talassémia	Reduz a expressão de CR1, o recetor que medeia a ligação dos eritrócitos não-parasitados aos parasitados, conferindo proteção contra a infecção malárica grave. Aumenta a quantidade de microeritrócitos em homozigóticos restaurando a quantidade de hemoglobina perdida, concedendo proteção contra a anemia grave.	Wellems, <i>et al.</i> , (2009)

### 1.6.1 Enzimopatias eritrocitárias

Os eritrócitos, durante a sua maturação, perdem o núcleo, as mitocôndrias e os ribossomos, impossibilitando estas células de realizar as vias metabólicas que envolvam estes organelos, como a fosforilação oxidativa e a síntese proteica.

Assim, para assegurarem a integridade da membrana plasmática e o estado funcional da hemoglobina, possibilitando o transporte adequado de oxigênio, estas células utilizam um metabolismo dependente das enzimas eritrocitárias, que catalisam duas das principais cadeias metabólicas: a glicólise e a via das pentose-fosfato (**Figura I.4**).



**Figura I.4: Metabolismo da glucose no eritrócito** HK, hexocinase; PGI, fosfoglicose isomerase; PFK, fosfofrutocinase; G6PD, glucose-6-fosfato-desidrogenase; TPI, Triosefosfato isomerase; G3PD, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; PGK, fosfoglicerato cinase; PGM, fosfoglicerato mutase (adaptado de Zwerschke, *et al.*, 2003).

Uma deficiência enzimática em alguma destas vias pode comprometer a produção de ATP (adenosina-trifosfato) e/ou de NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido), desencadeando alterações ao nível da membrana plasmática com consequente remoção celular (Jacobasch, *et al.*, 1996, Çakir, *et al.*, 2004 e Mohandas, *et al.*, 2008).

São várias as enzimopatias hereditárias já relatadas nestas vias metabólicas, onde se pode observar uma disparidade de frequências, variando de acordo com a enzima afetada e sobretudo com a distribuição geográfica. As deficiências em G6PD e em PK são a principal causa de anemia hemolítica não-esferocítica hereditária (Min-Oo, *et al.*,

2005; Cappellini, *et al.*, 2008 e Ayi, *et al.*, 2008) e, na literatura, têm sido associadas a um eventual efeito protetor contra a malária (Jacobasch, G., *et al.*, 1996), apresentando a deficiência em G6PD elevada prevalência em África.

#### 1.6.1.1 Glucose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PD)

A primeira enzima da via das pentose-fosfato é a G6PD, que catalisa a oxidação da glucose-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona (**Figura I.4**), com redução de NADP a NADPH, que permite a regeneração da glutathione (GSH). A glutathione exerce um papel importante na defesa antioxidante, pela redução de radicais e espécies reativas de oxigénio, e pela manutenção da hemoglobina e outras proteínas do eritrócito no seu estado reduzido. Qualquer deficiência na produção de NADPH pode acarretar graves consequências na capacidade de resposta das células ao *stress* oxidativo (Quintas, *et al.*, 2008).

A deficiência em G6PD, também denominada de favismo, é a enzimopatia mais comum, com mais de 400 milhões de indivíduos afetados a nível global. São reportadas elevadas prevalências em África, Sul da Europa, Médio Oriente, Sudeste Asiático e no centro e sul das ilhas do Pacífico. Recentemente também foram registadas elevadas prevalências na América do Norte e do Sul e em algumas regiões da Europa do Norte, devido essencialmente à recente migração (Scotto, 2010). Os sintomas dependem do grau da deficiência, mas a maioria dos indivíduos são assintomáticos até serem expostos a fatores causadores de *stress* oxidativo, como fármacos (incluindo alguns antimaláricos como a primaquina), certos alimentos (como favas, originando o termo favismo) ou infeções. Nesta situação podem apresentar um quadro de anemia hemolítica e icterícia (Scotto, 2010 e Cappellini, *et al.*, 2008).

O gene que codifica a G6PD encontra-se na região cromossómica Xq28, é constituído por 13 exões e 12 intrões, tem aproximadamente 20kb no total, codifica 515 aminoácidos e apresenta uma região promotora rica em CG (mais de 70%). O *locus* *G6PD* é talvez um dos *loci* mais polimórficos nos humanos, com cerca de 400 variantes alélicas já descritos (Nkhoma, *et al.*, 2009). Estas variantes são agrupadas em cinco classes (**Tabela I.5**) baseadas na atividade enzimática e nas manifestações clínicas observadas na deficiência em G6PD. Cerca de 140 mutações já foram reportadas, sendo na maioria mutações pontuais não-sinónimas. Estas variantes vão influenciar o grau de deficiência enzimática e consequentemente o quadro clínico do doente.

**Tabela I.5: Classes da deficiência em G6PD** (adaptado de Cappellini, *et al.*, 2008).

Escalões	Definição
<b>Classe I</b>	Deficiência grave, associada com anemia hemolítica não-esferocítica crónica
<b>Classe II</b>	Deficiência grave (1-10% da atividade enzimática normal), associada com anemia hemolítica aguda
<b>Classe III</b>	Deficiência moderada (10-60% da atividade enzimática normal)
<b>Classe IV</b>	Atividade enzimática normal (60-150%)
<b>Classe V</b>	Aumento da atividade enzimática (> 150%)

A hereditariedade desta patologia está ligada ao cromossoma Xq28. Por conseguinte, sendo os homens hemizigóticos para o gene G6PD, poderão apresentar uma expressão normal ou deficiente deste gene, enquanto as mulheres, apresentando duas cópias do gene, geralmente precisam da homozigotia dos alelos associados à deficiência para ostentar uma expressão deficiente. Se heterozigóticas, as mulheres exibem expressão intermédia do gene, devido à inativação aleatória de um dos cromossomas X nas diferentes células (efeito de mosaico genético) (Cappellini, *et al.*, 2008).

A atividade enzimática normal é conferida pelo alelo ancestral *G6PD B*, que apresenta uma distribuição mundial, em contraste com as variantes que causam a deficiência enzimática, apresentando uma distribuição geográfica mais localizada. Em África, existem três alelos polimórficos principais: o alelo ancestral *G6PD B*, com uma frequência de 60 a 80%; o alelo *G6PD A*, que estando associado a uma atividade enzimática de cerca de 85% da atividade enzimática normal, afeta cerca de 15 a 40% da população; e, por fim, o alelo *G6PD A<sup>-</sup>*, que estando associado a apenas 12% da atividade enzimática normal, tem uma frequência que varia de 0 a 25%. A segunda variante alélica mais comum é a *G6PD Med*, encontrada nos países circundantes do Mar Mediterrâneo, da Índia e da Indonésia, estando associada a cerca de 3% da atividade enzimática normal e cuja frequência varia entre 2 a 20%. No sudeste Asiático, foi observado também o alelo *G6PD Mahidol* que, associado a uma atividade de 5 a 32%

da normal, apresenta uma prevalência de 24% (Hedrick, P., 2011 e Cappellini, *et al.*, 2008).

É notável a similaridade entre a distribuição geográfica da deficiência em G6PD e as áreas endêmicas da infecção malárica, o que sugere a hipótese da redução da atividade enzimática conferir proteção parcial contra a malária (Hedrick, 2011). Os mecanismos envolvidos nesta proteção contra a malária em doentes deficientes em G6PD ainda não são totalmente compreendidos. No entanto, sabe-se que eritrócitos de indivíduos doentes são particularmente sensíveis ao *stress* oxidativo e esta resistência parece residir no enfraquecimento da membrana celular dos mesmos, com consequente hemólise e fagocitose, o que conduz a que o parasita não consiga completar o seu ciclo de vida e multiplicar-se (Quintas, *et al.*, 2008; Hedrick, 2011; Roth, *et al.*, 1983 e Cappadoro, *et al.*, 1998).

Estudos epidemiológicos também foram levados a cabo na tentativa de compreensão da “hipótese malária/G6PD”, no entanto não têm sido consistentes. Um estudo realizado na Gâmbia e no Quênia por Ruwende, *et al.* (1995), concluiu que a redução do risco de desenvolver malária grave por *P. falciparum* em homens hemizigóticos (*G6PD A*<sup>-</sup>) foi de 58%, enquanto que nas mulheres heterozigóticas (*G6PD BA*<sup>-</sup>) foi de 46%. Já na região do Mali, Guindo *et al.* (2007) observou uma diminuição do risco de desenvolver malária grave de 58% para homens hemizigóticos (*G6PD A*<sup>-</sup>), enquanto nas mulheres heterozigóticas (*G6PD BA*<sup>-</sup>) não observou qualquer efeito protetor. Aumentando esta controvérsia de resultados, Johnson, *et al.* (2009) efetuaram um estudo na população do Uganda onde demonstraram a ausência de um efeito protetor em homens hemizigóticos e em mulheres heterozigóticas, associando alguma proteção contra a malária apenas nas mulheres homozigóticas deficientes (*G6PD A*<sup>-</sup>*A*<sup>-</sup>).

A investigação ao nível da datação de variantes desta deficiência tem evidenciado a hipótese de ambos os parasitas, *P. falciparum* e *P. vivax*, isolados ou em conjunto desencadearam a seleção desta deficiência na população Africana (Carter, *et al.*, 2002 e Leslie, *et al.*, 2010).

#### 1.6.1.2 Piruvato Cinase (PK)

A enzima piruvato cinase catalisa o último passo da cadeia glicolítica, uma reação de desfosforilação-fosforilação que converte fosfoenolpiruvato em piruvato e

ATP (**Figura I.4**). O controlo da atividade desta enzima é de grande importância devido ao papel central que desempenha no metabolismo geral da célula, nomeadamente nos ajustes à velocidade a que decorre a glicólise.

As variantes patogénicas da enzima alteram a sua conformação, por modificação do local de ligação do substrato, ou através do contacto entre subunidades, diminuindo assim a atividade enzimática e o fluxo da via glicolítica. Desta forma, diminui a síntese de ATP, principalmente nos eritrócitos (que dependem exclusivamente desta via metabólica para obter ATP), causando a sua lise (Quintas, *et al.*, 2008).

A deficiência em PK apresenta uma distribuição cosmopolita e é considerada a enzimopatia glicolítica mais comum. É uma doença autossómica recessiva, caracterizada por um quadro clínico de anemia hemolítica não-esferocítica, de gravidade variável, sendo necessária, na forma mais severa, a transfusão sanguínea logo à nascença (Ayi, *et al.*, 2008).

Na composição genómica dos mamíferos estão englobados dois genes distintos da PK, *PKLR* e *PKM*, que originam quatro isoenzimas, PKL, PKR, PKM1 e PKM2, expressas em tecidos diferentes, dependendo da ação dos promotores específicos de cada tecido (Zanella, *et al.*, 2007). O gene *PKLR* presente no cromossoma 1q21 codifica as isoenzimas PKL e PKR. PKL é expressa no fígado, intestino delgado e córtex renal, enquanto que PKR é expressa exclusivamente por eritrócitos. PKM1 encontra-se no coração, cérebro e músculo-esquelético, e PKM2 está presente nas células fetais e em tecidos tumorais (Min-Oo, *et al.*, 2005 e Christofk, *et al.*, 2008).

O gene *PKLR*, com aproximadamente 8,6kb, é composto por 12 exões e 11 intrões, apresentando o exão 1 e 2 especificidade para as isoenzimas PKR e PKL, respetivamente, sendo os restantes exões partilhados (Jacobasch, *et al.*, 1996).

Existem mais de 180 mutações descritas no gene humano *PKL* e os sintomas clínicos aparecem nos indivíduos homozigóticos ou heterozigóticos compostos para o alelo mutado. A frequência desta patologia é altamente variável. Estudos de prevalência realizados na América do Norte, na Europa e em algumas regiões da Ásia observaram que a prevalência de heterozigóticos varia entre de 1% a 3,6% nestas regiões. Um estudo realizado em Afroamericanos sugere que a frequência de heterozigóticos é 2,4 vezes mais comum em Africanos do que em Caucasianos (Durand, *et al.*, 2008).



Estudos genéticos *in vivo* identificaram a deficiência em PK no modelo murino, como indutora de proteção contra a malária (Min-Oo, *et al.*, 2003), podendo este fenómeno estender-se aos humanos. Durand, *et al.* (2008) demonstraram que eritrócitos humanos deficientes em PK são resistentes à infecção malárica por *P. falciparum in vitro*, apoiando assim os resultados obtidos *in vivo* em modelo murino. Os mecanismos envolvidos neste efeito protetor são ainda desconhecidos, no entanto são sugeridas algumas hipóteses, baseadas na depleção de ATP celular. A diminuição de ATP na célula induz o *cross-linking* das proteínas membranares (Palek, *et al.*, 1978), comprometendo a invasão, replicação e saída do parasita. Um estudo populacional, envolvendo a pesquisa de assinaturas de seleção da malária no gene *PKLR*, em duas populações Africanas de Angola e Moçambique, sugere que a pressão seletiva da malária está a atuar nesta região genómica, teoria suportada, entre outros sinais, por um significativo desequilíbrio de *linkage* desta região em indivíduos com infecção malárica não-grave (Machado, *et al.*, 2010; Machado, *et al.*, *In press*), apoiando assim, os resultados anteriores.

Embora existam evidências que favorecem a hipótese associativa desta patologia com a malária devido a uma pressão seletiva, são necessários estudos adicionais, genéticos e epidemiológicos, que permitam elucidar esta possibilidade (Manco, *et al.*, 2001; Min-Oo, *et al.*, 2008; Machado, *et al.*, 2010).

## **2. Triosefosfato isomerase (TPI)**

### **2.1 Gene**

O gene *TPI* localiza-se na região cromossómica 12p13 com um tamanho molecular total de 3,5kb. A sequência funcional do gene está dividida em 7 exões e 6 intrões, apresentando também, sem função aparente, 3 pseudogenes processados, ausentes de intrões e integrados em *loci* cromossómicos diferentes (Brown, *et al.*, 1985).

A região promotora do gene é extremamente rica em GC (73%), sendo constituída por uma atípica caixa TATA (5'-TATATAA-3'; -22 a -28) e um singular *Cap proximal element* (CPE; -6 a -12) (Brown, *et al.*, 1985 e Boyer, *et al.*, 1990).

## 2.2 Enzima

A enzima TPI catalisa a isomerização do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e fosfato de dihidroxiacetona (DHAP), com um papel importante na glicólise, na gluconeogénese, na síntese de ácidos gordos e na via das pentose-fosfato. É uma enzima dimérica com cerca de 248 resíduos de aminoácidos por subunidade (Maquat, *et al.*, 1985).

A enzima TPI é necessária para o crescimento e manutenção celular. Por conseguinte, o gene *TPI* é considerado um gene *housekeeping*, expresso em todos os tipos de células (Brown, *et al.*, 1985).

## 2.3 Deficiência em TPI

Descrita pela primeira em 1965 por Schneider, *et al.*, a deficiência em TPI é uma patologia autossómica recessiva rara.

Clinicamente, a deficiência em TPI é assintomática em heterozigóticos, apresentando atividade enzimática intermédia (cerca de 50% da atividade enzimática normal), e manifesta-se numa síndrome variável em indivíduos homozigóticos e heterozigóticos compostos, marcada por uma forte diminuição da atividade enzimática (aproximadamente 2 a 20% da atividade enzimática normal). A sintomatologia apresentada por homozigóticos e heterozigóticos compostos é caracterizada não só por uma anemia hemolítica não-esferocítica congénita, comum à maioria das enzimopatias glicolíticas, mas também por uma degeneração neuromuscular grave e progressiva, que tem início, sensivelmente no sétimo mês de vida. Por vezes, são assinalados distúrbios cerebrais e uma propensão aumentada para infeções.

Definida como a mais grave das enzimopatias glicolíticas, a deficiência em TPI culmina frequentemente na morte durante o período fetal ou na infância antes dos 5 anos de idade. Não existe tratamento eficaz para esta deficiência, sendo aconselhado o diagnóstico pré-natal nas famílias com história clínica da doença (Schneider, 2000; Valentin, *et al.*, 2000 e Orosz, *et al.*, 2009).

Nos eritrócitos não é conhecido outro mecanismo de conversão de DHAP em G3P, sendo este assegurado apenas pela enzima TPI. Indivíduos doentes exibem uma concentração aumentada do substrato DHAP de 20 a 60 vezes em eritrócitos, o que evidencia um bloqueio metabólico no quinto passo da glicólise (Schneider, *et al.*, 1965).

Já foram reportadas várias mutações no gene *TPI*, algumas associadas a quadros clínicos muito graves. A **Tabela I.6** sumariza as mutações identificadas até ao momento. Um estudo de Arya, *et al.* (1997), incluindo sete famílias da Europa do Norte com casos de deficiência em TPI, mostrou que 79% dos indivíduos clinicamente afetados apresentava alterações na variante não-sinónima Glu104Asp (ou TPI 1591C), presente no codão 104 do gene *TPI*, sendo não só a mutação mais comum como também a mais severa (Daar, *et al.*, 1986). A mutação pontual diminui a estabilidade da enzima, resultando no *unfolding* e na perda da atividade enzimática a temperaturas corporais normais com consequências em todas as vias metabólicas onde a TPI é necessária (Schneider, 2000 e Quintas, *et al.*, 2008).

O gene *TPI* reúne várias mutações justificativas de um padrão hereditário nesta patologia. Consequentemente, o grau de gravidade está associado aos diferentes graus de atividade enzimática de acordo com as mutações sofridas. (Valentin, *et al.*, 2000 e Brown, *et al.*, 1985)

**Tabela I.6: Polimorfismos descritos no gene *TPI*** (adaptado de Schneider, 2000).

Mutações / variantes	Referências
Promotor -5 (A>G), -8 (G>A), -24 (T>G)	Watanabe, <i>et al.</i> (1996)
Inic. (ATG: Met → AAG: Lys)	Schneider, <i>et al.</i> (1996)
28 (CTG: Leu → deleção das bases TG: mutação <i>frameshift</i> )	Schneider, <i>et al.</i> (1996)
41 (TGT: Cys → TAT: Tyr)	Arya, <i>et al.</i> (1995)
62 (GCT: Ala → GAT: Asp)	Manco, <i>et al.</i> (2007)
72 (GGG: Gly → GCG: Ala)	Watanabe, <i>et al.</i> (1996)
104 (GAG: Glu → GAC: Asp)	Daar, <i>et al.</i> (1986)
122 (GGA: Gly → AGA: Arg)	Perry, <i>et al.</i> (1992)
145 (GAG: Glu → TAG: Stop)	Schneider, <i>et al.</i> (1996)
154 (GTG: Val → ATG: Met)	Watanabe, <i>et al.</i> (1996)
170 (ATT: Ile → GTT: Val)	Arya, <i>et al.</i> (1995)
189 (CGA: Arg → TGA: Stop)	Daar, <i>et al.</i> (1988)
231 (GTG: Val → ATG: Met)	Neubauer, <i>et al.</i> (1992)
240 (TTC: Phe → CTC: Leu)	Chang, <i>et al.</i> (1993)

Inic.:codão de iniciação

### 2.3.1 Elevada incidência de heterozigóticos em Afroamericanos

Apesar de rara, a deficiência em TPI tem sido reportada em todo o Mundo. Estudos epidemiológicos permitiram caracterizar a nível molecular 21 famílias, com casos reportados nos Estados Unidos da América, Inglaterra, França, Alemanha, Grécia, Turquia, Hungria, Austrália e Portugal, sendo que 9 destas famílias apresentava origem Africana.

Mohrenweiser, *et al.* (1982) realizaram um estudo populacional baseado na determinação da atividade da enzima TPI em eritrócitos, demonstrando uma variação interétnica entre heterozigóticos para a deficiência em TPI. As frequências alélicas reportadas foram de 0,0024 para a população Caucasiana e de 0,024, dez vezes mais frequente, para o grupo Afroamericano. Para os alelos homozigóticos, as frequências são muito reduzidas: 0,0019 e 0,0034 para Caucasianos e Afroamericanos, respetivamente. A raridade de homozigóticos parece indicar a presença de alelos nulos no gene *TPI*, que em homozigotia causam embriofetilidade.

A partir deste estudo, Watanabe, *et al.* (1996) reportam a reanálise das amostras estudadas na investigação anterior, com a finalidade de definir a base molecular dos casos com reduzida atividade enzimática. No grupo Afroamericano, em sete indivíduos heterozigóticos, observaram dois polimorfismos -5 (A>G) e -8 (G>A) na região promotora do gene. Observando-se ainda um polimorfismo adicional -24 (T>G) em dois destes indivíduos. Duas destas substituições estão situadas em sequências reguladoras, -8 no CPE e a -24 inserida na caixa TATA.

A associação entre os polimorfismos da região promotora, descritos na análise anterior, e a elevada incidência na população Afroamericana foi alvo de investigação pela equipa de Schneider (1998), que determinaram os haplótipos para os três polimorfismos (-5, -8 e -24), em Afroamericanos e em Caucasianos. As variantes haplotípicas são mais prevalentes em Afroamericanos (cerca de 41%). Foi também observado que, isolado, o polimorfismo -5G não afeta a atividade da enzima TPI, contrariamente aos polimorfismos -8A e -24G, que foram associados a uma diminuição moderada da atividade enzimática (Schneider, *et al.*, 1998 e Humphries, *et al.*, 1999b). Foi observado o genótipo -5GG/-8AA em indivíduos normais, excluindo um possível efeito deletério destes polimorfismos em homozigotia sugerido, anteriormente por Mohrenweiser, *et al.* (1982).

O gene *TPI* voltou a ser foco de pesquisa pelo grupo de Humphries (1999), tendo avaliado as sequências genômicas do promotor da TPI em diferentes grupos étnicos, incluindo África subsariana, Caraíbas, Europa do Norte, Mediterrâneo, Médio Oriente, Índia e Oriente, tendo como principal objetivo determinar a prevalência e a distribuição geográfica das variantes da região promotora do gene *TPI*. Este estudo veio corroborar uma distribuição geográfica generalizada dos alelos variantes do promotor da TPI, registrando elevadas frequências nas populações de África, Caraíbas e Oriente (Humphries, *et al.*, 1999).

Em todas as populações estudadas, o alelo -5G e haplótipos associados estão em desequilíbrio de *linkage* com o polimorfismo intragénico no intrão 5, nucleótido 2262G do gene *TPI*. Foi sugerido que o padrão de haplótipos observado pode estar relacionado com a origem evolutiva Africana que antecede a dispersão das populações humanas modernas (Humphries, *et al.*, 1999).

### 2.3.2 Associação com a malária

Não há qualquer relato de associação desta enzimopatia com a malária, mas a elevada frequência destes alelos em África é remanescente para outros exemplos de diversidade genética nesta população. Por exemplo, os polimorfismos associados à G6PD, ligados ao efeito protetor contra a infeção malárica grave, são igualmente frequentes nesta região.

As variações polimórficas do promotor da TPI manifestam maior prevalência em indivíduos de origem Africana. Segundo Schneider, *et al.* (1998) as elevadas frequências observadas podem dever-se a uma vantagem seletiva para a sobrevivência.

Em 2009, Manco *et al.*, investigaram as alterações do promotor do gene *TPI* em 3 populações de África subsariana e, num estudo preliminar, testaram as frequências haplotípicas destes 3 grupos em indivíduos com malária, de acordo com a gravidade da doença. Foi relatada a diversidade do gene *TPI* nesta região Africana. Contudo, não foi detetada qualquer associação entre as variações da região promotora do gene e um efeito protetor contra a malária. No entanto, neste trabalho, a dimensão amostral era muito reduzida e são necessários estudos epidemiológicos mais abrangentes para clarificar esta suposta associação entre o mecanismo de resistência inata e a resistência contra este problema de saúde pública mundial.

### 3. Objetivos e Justificação

A malária é reconhecida como um grave problema de saúde pública em todo o Mundo. Inúmeras pesquisas têm sido feitas para alcançar a cura da doença. Não obstante os avanços científicos, até agora nenhuma tentativa demonstrou total eficácia terapêutica.

O parasita *Plasmodium* sp. apresenta um ciclo de vida bastante complexo, envolvendo complexas interações entre o parasita e o(s) hospedeiro(s), o que torna a investigação da malária um enorme desafio. Apenas uma pequena parcela das infecções causadas pelo protozoário evolui para formas graves ou letais, o que revela a existência de mecanismos adaptativos entre as duas espécies, resultantes da longa convivência do Homem com o parasita. Vários fatores terão contribuído para estes diferentes desenlaces de uma infecção, proporcionando a seleção dos indivíduos mais aptos para uma convivência conjunta e vice-versa, o parasita também terá desenvolvido estratégias capazes de permitir e/ou tornar mais viável a sua sobrevivência no hospedeiro humano.

A pressão seletiva exercida pela malária no genoma humano, desde há cerca de 10 000 anos, tem contribuído para a seleção de uma variedade de polimorfismos que propiciam maior resistência ao protozoário; portanto, a espécie humana, na condição de hospedeiro, acumulou inúmeras adaptações já descritas que lhe conferiram resistência ao *Plasmodium* sp. e aos efeitos que a sua infecção provoca no organismo.

Um dos desafios na luta contra esta doença é compreender estes determinantes de suscetibilidade e decifrar os mecanismos envolvidos a fim de os utilizar como novos alvos para fármacos ou vacinas.

A deficiência em TPI é uma enzimopatia que afeta o metabolismo energético, comprometendo a sobrevivência de células dependentes da glicólise para este processo, como é o caso dos eritrócitos. Uma vez que os eritrócitos são parte integrante do ciclo biológico do *Plasmodium* sp., quaisquer alterações nas suas vias metabólicas e funcionais são alvos merecedores de estudo, não só ao nível da enzimopatia em si, mas também na associação destas enzimopatias com a malária.

Vários estudos têm demonstrado uma elevada incidência de heterozigóticos para a deficiência em TPI em indivíduos de origem Africana, nomeadamente ao nível dos polimorfismos do promotor do gene -5 (A>G), -8 (G>A), -24 (T>G), mas ainda sem justificação aparente.

O presente trabalho tem como principal objetivo a pesquisa de marcadores polimórficos de seleção de malária no gene humano *TPI* numa amostra populacional Africana, tendo como objetivos secundários:

- Analisar a prevalência dos polimorfismos do promotor em diferentes grupos clínicos de malária, tendo em vista testar a associação destas variantes polimórficas com a malária;
- Analisar a prevalência da mutação Glu104Asp, a mais comum neste gene a nível mundial;
- Fazer um rastreio de todos os exões a fim de detetar eventuais novas variantes ainda não descritas;
- Documentar a variação haplotípica associada aos polimorfismos do promotor, tendo em vista obter informação sobre a antiguidade destes;
- Compreender se a pressão exercida pela malária no genoma humano terá contribuído para as elevadas incidências desta enzimopatia em indivíduos de origem Africana.

## **II - MATERIAIS E MÉTODOS**

---



## 1. Área de estudo

Neste estudo foram utilizadas amostras de sangue periférico recolhidas maioritariamente no Hospital Central de Maputo, e em menor número, na cidade de Manhica, por busca ativa.

Maputo é a capital de Moçambique, situada no extremo sul do país, apresenta uma área de 346 77 km<sup>2</sup> e tem aproximadamente 1 094 315 de habitantes (Perfil Estatístico do Município de Maputo, 2007-2008). Esta cidade apresenta um clima tropical e húmido, propício à propagação da malária, que atinge o seu pico de transmissão após a época chuvosa de dezembro a abril (Portal do Governo de Moçambique e Documento Estratégico para o Controlo da Malária em Moçambique, PNCM, Julho 2006-2009).

Segundo o Ministério da Saúde de Moçambique, a malária continua a ser o principal desafio para a saúde pública e para o desenvolvimento sustentável do país, registando-se no período de janeiro a junho de 2011 um total de 2 065 618 casos de malária e 1266 óbitos (Boletim Epidemiológico Nº 2/2011, Ministério da Saúde de Moçambique). Esta patologia é o principal motivo de consulta externa (40%) e de internamento no serviço de pediatria (60%), apresentando a principal causa de mortalidade nos hospitais de Moçambique, aproximadamente 30% dos óbitos registados (Documento Estratégico para o Controlo da Malária em Moçambique, PNCM, Julho 2006-2009).

## 2. Amostras Biológicas

O DNA utilizado neste estudo provém de 112 amostras sanguíneas recolhidas em Moçambique: 99 no período de setembro a novembro de 2008, no Hospital Central de Maputo e, as restantes 13 por Marques, *et al.* (2005) no distrito de Manhica nas épocas, seca (agosto, 2001) e húmida (fevereiro, 2002). Estas amostras foram selecionadas de um conjunto de isolados por estarem caracterizadas para a presença/ausência de infeção.

Este ensaio engloba apenas indivíduos infetados, agrupados nos seguintes grupos clínicos: 92 amostras pediátricas (51 com infeção malárica não-grave e 41 com infeção malárica grave) compreendendo a faixa etária dos 4 meses aos 7 anos de idade;

7 amostras do banco de sangue (indivíduos assintomáticos) e, 13 amostras obtidas por busca ativa (indivíduos assintomáticos), abrangendo todas as idades.

Os grupos clínicos de malária grave e não-grave englobam apenas indivíduos infectados com *P. falciparum* e o grupo dos indivíduos assintomáticos apresenta indivíduos infectados por *P. falciparum* (16 infecções simples e 3 infecções mistas: *P. falciparum* + *P. ovale*, *P. falciparum* + *P. malariae* e, *P. falciparum* + *P. ovale* + *P. malariae*) e uma infecção por *P. malariae*.

## 2.1 Colheita e armazenamento das amostras

O sangue periférico foi recolhido por punção digital e conservado em papel de filtro Schleicher & Schuel, S&S®903™ para posterior extração de DNA.

## 2.2 Extração de DNA

O DNA obtido destas amostras já estava disponível para este estudo, tendo sido preparado através de um protocolo de extração por fenol-clorofórmio. Dado que, no decorrer dos vários ensaios realizados, algumas destas amostras deixaram de apresentar quantidade suficiente para a conclusão do estudo, foi necessário proceder novamente à extração do DNA a partir do papel de filtro através da técnica de fenol/fenol-clorofórmio descrita por Snounou, *et al.* (1993).

Este procedimento engloba 3 fases: lise, extração e precipitação de DNA. Na fase de lise, recortou-se uma gota de sangue do papel Schleicher & Schuel, S&S®903™ com uma tesoura previamente desinfetada com lixívia e passada por água. Seguidamente, colocou-se a mancha de sangue dentro de um tubo tipo eppendorf, de 1,5mL, devidamente identificado, repetindo-se estes passos cuidadosamente para cada amostra. A fim de controlar eventuais contaminações inter-amostras, entre cada cinco, colocou-se um “branco” – pedaço do mesmo papel de filtro sem amostra, para o qual se seguiu exatamente os mesmos procedimentos que para as restantes amostras. Posteriormente, foi adicionado 1mL de PBS+Saponina (0,05%), submeteram-se os tubos a uma centrifugação de 20 200g, durante 10 minutos, e desperdiçou-se o sobrenadante. Adicionou-se 1mL de PBS e voltou a centrifugar-se os tubos a 20 200g, durante 10 minutos, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 30µL de tampão de lise e 75µL de Pronase E (2mg/mL). Colocaram-se as amostras a 37°C durante a noite.

A fase seguinte é a de extração de DNA, que se inicia com a adição de 300µL de água ultrapura e 500µL de fenol equilibrado a cada tubo com posterior centrifugação de 20 200g, durante 10 minutos. O sobrenadante é recuperado e adicionado a um novo tubo contendo 500µL de fenol/clorofórmio equilibrado, centrifugando-se de seguida.

Para finalizar, as amostras são submetidas à fase de precipitação de DNA, retirando-se o sobrenadante que é adicionado a um novo tubo contendo uma solução de 45µL de acetato de sódio + 1mL de etanol absoluto; seguidamente, deixam-se as amostras a -20°C durante a noite. Consecutivamente, são submetidas a uma centrifugação de 20 200g durante 15 minutos, rejeita-se o sobrenadante e adiciona-se 800µL de etanol a 80%. Após uma nova centrifugação e rejeição do sobrenadante, o DNA foi seco numa estufa a 37°C e posteriormente eluído em 20µL de tampão TE, de modo a que aproximadamente 1µl de solução de DNA corresponda a 5µl de sangue total.

### **2.3 Aspetos éticos**

Com respeito à pesquisa em Moçambique, a colheita de isolados humanos foi aprovada pelo Comité de Ética local (Comité Nacional de Bioética para a Saúde, Ministério da Saúde de Moçambique, IRB 00002657, ref. 226/CNBS/08) e pelo IHMT (Conselho de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, CEIHMT, 14-2011-PN). O plano de trabalho pormenorizado, os questionários e os formulários de consentimento informado foram submetidos aos Comités de Ética das instituições envolvidas neste estudo, tendo sido obtida a aprovação da pesquisa. Cada indivíduo, assim como o parente/tutor das crianças foi informado da natureza e dos objetivos do estudo. Todos foram informados, por comunicação oral, da participação voluntária. Foi obtido, por escrito, de cada pessoa (ou parente/tutor) o respetivo consentimento informado. A colheita de amostras sanguíneas seguiu rigorosos requisitos estabelecidos pelos Comités de Ética: foi utilizado o volume excedente das amostras de sangue, previamente coletadas para o diagnóstico médico das crianças assistidas no Departamento Pediátrico; no Banco de Sangue, durante a doação de sangue, um pequeno volume foi colocado de parte num tubo. Desta forma, não foi necessário uma colheita extra de sangue e o paciente, a doação sanguínea e a rotina dos serviços de saúde não foram significativamente perturbados.

### 3. Técnicas moleculares

#### 3.1 Análise dos polimorfismos -5, -8 e -24 do promotor da TPI

##### 3.1.1 PCR-RFLP (*PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism*)

O princípio desta técnica baseia-se na digestão de um fragmento de DNA amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com enzimas de restrição ou endonucleases, que catalisam a clivagem do fragmento em regiões específicas (zonas alvo), de forma a obter um padrão de bandas característico, quando se submete o produto desta digestão à electroforese em gel de agarose ou poliacrilamida.

A pesquisa dos polimorfismos -5, -8 e -24 na região promotora do gene *TPI* baseou-se no procedimento de PCR-RFLP descrito por Schneider, *et al.* (1998).

##### 3.1.1.1 Reação de PCR

Para amplificar a região promotora do gene *TPI*, utilizaram-se os oligonucleótidos: TPI-PROM F, 5'-GGCCATGGCGGAGGACGGCG-3' e TPI-PROM R, 5'-GCCAGACCCCTCCTCGGCGA-3', com a mistura de reação e condições de amplificação descritas nas **Tabelas II.1** e **II.2**, respetivamente. Cada grupo de reações de amplificação incluiu um controlo negativo (sem DNA) e um controlo positivo.

**Tabela II.1: Mistura de reação para amplificação da região promotora do gene *TPI*.**

Reagente	Concentração do stock	Concentração da mistura	Volume por amostra (μL)
Água			27,5
Tampão	5x	1x	10
MgCl <sub>2</sub>	25mM	3mM	6
dNTP	5mM	0,1mM	1
TPI-PROM F	2,5μM	0,08 μM	1,5
TPI-PROM R	2,5μM	0,08 μM	1,5
Taq			0,5
DNA			2
Total			50

**Tabela II.2: Condições de amplificação da região promotora do gene *TPI*.**

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	3min	1x
Desnaturação	94	45seg	35x
Hibridação dos Oligonucleótidos	62	45seg	
Extensão	72	45seg	
Extensão final	72	7min	1x
Manutenção	4		

### 3.1.1.2 Reação de restrição enzimática

O fragmento de DNA amplificado (258pb) foi submetido a digestões enzimáticas com diferentes enzimas de restrição: TseI, MscI e SfcI, para analisar a presença dos polimorfismos -5, -8 e -24, respetivamente. As misturas de reação e condições da digestão enzimática estão apresentadas nas **Tabelas II.3, II.4 e II.5**.

Seguidamente o produto da digestão enzimática (20μL) foi submetido a uma electroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,05mg/100mL), durante 1 hora, a uma voltagem de 120V em tampão TBE 1x (Tris 0,1M; Ácido Bórico 0,1M; EDTA 5mM). A observação dos fragmentos obtidos (**Tabela II.5**) foi feita num transiluminador sob luz ultravioleta. Foi usado o marcador molecular de 100bp *DNA ladder* (Fermentas).

**Tabela II.3: Composição da mistura de reação para a restrição enzimática com TseI e MscI.**

Reagentes	Concentração do stock	Concentração da mistura	Volume por amostra (μL)
Água			7,8
Tampão NEBuffer 4	10x	1x	2
Enzima	<b>TseI</b>	5 U/μL	0,2
	<b>MscI</b>	5 U/μL	
DNA amplificado			10
Total			20

**Tabela II.4:** Composição da mistura de reação para a restrição enzimática com SfcI.

Reagentes	Concentração do stock	Concentração da mistura	Volume por amostra (μL)
Água			7,6
Tampão NEBuffer 4	10x	1x	2
<b>SfcI</b>	10 U/μL	0,1U/μL	0,2
BSA	1g/mL	100μg/mL	0,2
DNA amplificado			10
Total			20

**Tabela II.5:** Condições da digestão enzimática das enzimas TseI, MscI e SfcI e respectivos tamanhos dos fragmentos esperados.

Polimorfismo	Enzima	Temperatura (°C)	Tempo	Fragmentos (pb)
-5 (A>G)	TseI	65		188 + 70
-8 (G>A)	MscI	37	4h	191 + 67
-24 (T>G)	SfcI	37		204 + 54

### 3.2 Análise da mutação Glu104Asp

#### 3.2.1 PCR-RFLP

Para analisar a presença da mutação Glu104Asp, nas amostras em estudo, aplicou-se a técnica de PCR-RFLP anteriormente descrita, baseada na de Schneider *et al.* (1995).

##### 3.2.1.1 Reação de PCR

Para esta amplificação os oligonucleótidos utilizados foram: TPI-Glu104Asp F, 5'-AAGGCTTTCTTTAGTCTCAT-3' e TPI-Glu104Asp R, 5'-TGTGGCCCTGGATA-GGCTCA-3' nas condições descritas nas **Tabelas II.6 e II.7**.

##### 3.2.2.2 Reação de restrição enzimática

O fragmento de DNA obtido (617pb) foi, posteriormente, digerido com a enzima DdeI, nas condições descritas nas **Tabelas II.8 e II.9**.

**Tabela II.6: Mistura de reação para amplificação da região contendo a mutação Glu104Asp do gene *TPI*.**

Reagente	Concentração do stock	Concentração da mistura	Volume por amostra (μL)
Água			27,5
Tampão	5x	1x	10
MgCl <sub>2</sub>	25mM	3mM	6
dNTP	5mM	0,1mM	1
TPI-Glu104Asp F	2,5μM	0,08 μM	1,5
TPI- Glu104Asp R	2,5μM	0,08 μM	1,5
Taq			0,5
DNA			2
Total			50

**Tabela II.7: Condições de amplificação da região contendo a mutação Glu104Asp do gene *TPI*.**

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	94	3min	1x
Desnaturação	94	45seg	35x
Hibridação dos oligonúcleotidos	56	45seg	
Extensão	72	1min	
Extensão final	72	7min	1x
Manutenção	4		

**Tabela II.8: Composição da mistura de reação para a restrição enzimática com DdeI.**

Reagentes	Concentração do stock	Concentração da mistura	Volume por amostra (μL)
Água			7,8
Tampão NEBuffer 3	10x	1x	2
<b>DdeI</b>	10 U/μL	0,1 U/μL	0,2
DNA amplificado			10
Total			20

Continuamente foram aplicados 20µL do produto da digestão enzimática num gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,05mg/100mL), onde foi submetido a uma corrida electroforética, durante 1 hora, a 120V em tampão TBE 1x. A observação dos fragmentos obtidos (**Tabela II.9**) foi feita num transiluminador sob luz ultravioleta. Foi usado o marcador molecular de 100bp *DNA ladder*.

**Tabela II.9: Condições da digestão enzimática da enzima DdeI, e respetivos tamanhos dos fragmentos esperados.**

Polimorfismo	Enzima	Temperatura (°C)	Tempo	Fragmentos (pb)
Glu104Asp (G>C)	DdeI	37	4h	288+205+81+41

### 3.3 Rastreio de todos exões do gene *TPI* por PCR-SSCP (PCR- *Single-Strand Conformational Polymorphism*)

A detecção de alterações genéticas por análise de polimorfismos conformacionais de DNA em cadeia simples (SSCP) baseia-se nas diferentes conformações que os fragmentos de DNA de cadeia simples, após desnaturação, adquirem devido à substituição de um ou mais nucleótidos. Estes fragmentos apresentam diferentes estruturas conformacionais, o que faz com que migrem de forma diferente quando sujeitos a electroforese em gel de poliacrilamida. Os padrões de migração resultantes são visualizados por coloração com nitrato de prata. A sensibilidade e simplicidade do método permite analisar um grande número de amostras e torna-se bastante útil na detecção de polimorfismos conhecidos, por comparação com amostras controlo, já caracterizadas, e de polimorfismos desconhecidos, por apresentarem um padrão de bandas diferente (Orita *et al.*, 1989).

Foram rastreados os 7 exões do gene *TPI* nos 112 indivíduos estudados neste trabalho por análise SSCP, de forma a pesquisar possíveis alterações genéticas.

#### 3.3.1 Reação de PCR

Primeiramente, dividiu-se o gene em 6 fragmentos, possibilitando a amplificação destes separadamente por PCR, técnica baseada no protocolo descrito por Schneider, *et al.* (1998) (**Tabela II.10 e II.11**).



### 3.3.2 SSCP

Para a reação de SSCP foram retirados 3,5µL do produto de PCR, de cada amostra separadamente para cada fragmento, e adicionou-se o mesmo volume de solução desnaturante [azul de bromofenol e xilenocianol 0,1% (m/v); EDTA 10 mM; SDS 0,1% e formamida desionizada 95% (v/v)]. Esta mistura foi aquecida a uma temperatura de 95°C, durante 5 minutos, e posteriormente foi colocada a 6°C. Seguidamente, foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante vertical [acrilamida-bisacrilamida 40%; Glicerol 10% (v/v); TBE 50mM; com os polimerizantes: APS 0,1% e Temed 0,1%], com diferentes condições consoante o fragmento a analisar (**Tabela II.12**) e procedeu-se à eletroforese em tampão TBE 0,5x.

**Tabela II.10: Oligonucleótidos específicos usados para a amplificação dos vários fragmentos do gene *TPI*, tamanho dos fragmentos amplificados e temperatura de hibridação no PCR.**

Região do gene <i>TPI</i>	Oligonucleótidos (5'→3')	Fragmento (pb)	Temperatura de hibridação (°C)
Exão 1	F – GGCCATGGCGGAGGACGGCG R – GCCAGACCCCTCCTCGGCGA	258	62
Exão 2	F – AGGGCACTGGTTAGGAATTG R – GAGGGAAGGGTCCCACAC	286	56
Exão 3	F – TGAACCTTGGCTTCATC R – GACATCCCTTATCTTCTCTC	145	56
Exão 4	F – AAGGGATGTCTTTTCCAAGA R – CCTGACCCTACCCTCTGAGTC	356	56
Exões 5-6	F – TGGCTGGAGAGCTCTTTCTT R – AGCCCACTCCACCTCAGC	544	62
Exão 7	F – CTGAGGACTAGACTGAGC R – CACCATCAGAAGCATATGC	307	56

**Tabela II.11: Mistura de reação para amplificação dos fragmentos específicos do gene *TPI*.**

Reagente	Concentração do stock	Concentração da mistura	Volume por amostra (μL)
Água			14,4
Tampão	5x	1x	5
MgCl <sub>2</sub>	25mM	3mM	3
dNTP	5mM	0,1mM	0,5
Oligonucleótido F	2,5μM	0,08 μM	0,5
Oligonucleótido R	2,5μM	0,08 μM	0,5
Taq			0,1
DNA			1
Total			25

**Tabela II.12: Condição da eletroforese da reação de SSCP, consoante o fragmento a analisar.**

Região do gene <i>TPI</i>	Gel de poliacrilamida (%)	Eletroforese	
		Voltagem (V)	Tempo (h)
Exão 1	12	65	16
Exão 2	13	55	16
Exão 3	14	55	16
Exão 4	10	65	16
Exões 5-6	8	200	3
Exão 7	10	65	16

### 3.3.3 Coloração do gel com nitrato de prata

Após a eletroforese, os géis são corados com nitrato de prata. Primeiramente, são fixados numa solução de ácido acético a 10%, durante 20 minutos com agitação. Para retirar o excesso de ácido acético, foram realizadas duas lavagens sucessivas com água destilada. De seguida, procedeu-se à coloração destes com a solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) a 0,1% e formaldeído a 37%, durante 30 minutos, também com agitação constante. Os géis são lavados durante alguns segundos com água destilada para retirar o excesso da solução de coloração. Por fim, é adicionada uma solução de carbonato de sódio a 3%, formaldeído a 37% e tiosulfato de sódio a 10% até visualização das

bandas. A revelação foi bloqueada com uma solução de ácido acético a 10%. Cada gel foi lavado com água destilada, analisado e, por último, foi adicionada uma solução composta por glicerina a 87%, etanol a 96% e ácido acético 100% na proporção (1:1:1), durante 30 minutos com agitação. Seguidamente, é retirado o excesso de solução e estes são postos numa estufa a 37°C entre vidros de forma a secarem para poderem ser conservados.

### 3.4 Análise dos microssatélites (CTTTT)<sub>n</sub>, (CAG)<sub>n</sub> e (CTA)<sub>n</sub>

Com a finalidade de estudar a ancestralidade de alguns polimorfismos analisados neste estudo, foram genotipados três microssatélites na região cromossômica 12p13.31 (**Tabela II.13**). Nesta análise foram utilizados oligonucleótidos (oligonucleótido F) marcados com o fluorocromo Cy5 na extremidade 5'. Os produtos amplificados por PCR foram submetidos a electroforese num gel de poliacrilamida 8% (Reprogel High Resolution, GE Healthcare) num sequenciador automático de DNA ALFexpress II (Amersham Pharmacia Biotech). O tamanho dos fragmentos foi determinado automaticamente utilizando o programa ALFwin Fragment Analyser 1.00.

**Tabela II.13: Características dos STRs em estudo.**

STR <sup>a</sup>	Posição cromossômica <sup>a</sup>	Banda <sup>a</sup>	Localização <sup>a</sup>	Distância do gene <i>TPI</i>
(CTTTT) <sub>n</sub>	12:6897529-6897555		Intergénica	≈ 79 Kb a montante
(CAG) <sub>n</sub>	12:7045880-7045938	12p13.31	Gene ATN1 <sup>b</sup>	≈ 70 Kb a jusante
(CTA) <sub>n</sub>	12:7057416-7057445		Gene PTPN6 <sup>c</sup>	≈ 25 Kb a jusante

<sup>a</sup> UCSC;

<sup>b</sup> Proteína atrofina 1

<sup>c</sup> Proteína-tirosina fosfatase, não recetora tipo 6

#### 3.4.1 Reação de PCR

Para a amplificação dos fragmentos relativos a cada STR, foram utilizados oligonucleótidos desenhados a partir do *software* Primer 3 v.0.4.0 (Rozen, *et al.*, 2000), sequências descritas na **Tabela II.14**. Nas reações de PCR foi utilizado um kit Multiplex PCR (Qiagen), contendo Master Mix (Taq DNA polimerase, tampão de PCR e dNTPs), Solução Q e água destilada ultrapura nas concentrações descritas na **Tabela II. 15**.

As amplificações ocorreram nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C durante 15 minutos, seguindo-se um período de 30 ciclos com desnaturação a 94°C durante 15 segundos; hibridização dos oligonucleótidos a uma temperatura otimizada para cada STR (**Tabela II.14**), durante 1 minuto; e extensão a 72°C durante 1 minuto, finalizando a amplificação com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

**Tabela II.14: Oligonucleótidos específicos para cada STR e respectivas temperaturas de hibridização.**

STR	Oligonucleótidos (5'→3')	Temperatura de hibridização
(CTTT) <sub>n</sub>	F – TTGGAGTCGCAAGCTGAACTAGAG	60
	R – CCAGGAAGTTGAGGCTGCAGTGAA	
(CAG) <sub>n</sub>	F – CCCCTTCCCTCCCTCTACT	58
	R – GAGACATGGCGTAAGGGTGT	
(CTA) <sub>n</sub>	F – AATGAGCCATGTTCCCAAAC	60
	R – GAGTGCAGTGGTGCAGTCTC	

**Tabela II.15: Condições da reação de PCR, utilizando o kit Multiplex PCR Qiagen.**

Reagente	Concentração do stock	Concentração da mistura	Volume por amostra (μL)
Água			2
Solução Q	5x	1x	1,25
Mix M	25mM	3mM	6,25
Oligonucleótido F	2,5μM	0,08 μM	0,75
Oligonucleótido R	2,5μM	0,08 μM	0,75
DNA			1,5
Total			12,5

### 3.5 Sequenciação de DNA

Os produtos de PCR que apresentaram um perfil migratório distinto no rastreio de todos os exões do gene *TPI* por PCR-SSCP (ver seção 3.3) foram sequenciados.

Nas reações de sequenciação foi utilizado o kit *Big Dye® Terminator v1.1 cycle sequencing Kit* (Applied Biosystems). Procedeu-se primeiramente à purificação dos produtos de PCR: adicionando 1µL de ExoSAP a 4µL de produto amplificado, sendo o resultado submetido a 37°C durante 15 minutos e, posteriormente, a 80°C durante 15 minutos. Segue-se a extensão dos produtos amplificados que compreende a mistura de 6,5µL de água destilada, 2µL de produto amplificado, 1µL de Big Dye e 0,5µL de oligonucleótido F (conforme o fragmento do gene que se pretende sequenciar) (100ng/µL) (ver **Tabela II.10**), sendo esta posteriormente submetida a 25 ciclos nas seguintes condições: 96°C durante 20 segundos seguidos de 2 minutos a 60°C.

Os produtos da reação de sequenciação foram purificados com *DyeEx™ 2.0 spin columns kit* (Qiagen), recorrendo a um procedimento que consiste na centrifugação destas colunas a 3000rpm, durante 3 minutos, e adição posterior no topo da coluna do produto da reação de sequenciação a que se segue nova centrifugação a 3200rpm, durante 5 minutos. O DNA purificado foi aplicado diretamente no sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems).

### 3.6 Estimar a antiguidade das mutações -8G>A e -5G>A

A antiguidade das mutações -8G>A e -5G>A foi estimada com base na variação acumulada nos dois microssatélites, (CTTTT)<sub>n</sub> localizado ~79 kb a montante e (CAG)<sub>n</sub> localizado ~70 kb a jusante do gene *TPI*. Foi simulado o decréscimo do desequilíbrio gamético relativamente ao haplótipo original onde terá surgido a mutação e calculada a frequência do alelo de cada microssatélite originalmente associado a cada mutação nos cromossomas portadores dessa mutação em cada geração, através da seguinte **equação 1** (Seixas, *et al.*, 2001):

$$p_{(g,i)} = p_{(g-1,i)} (1-\mu-\theta) + \theta q_i + (\mu/2) [p_{(g-1,i-1)} + p_{(g-1,i+1)}] \quad \text{Equação 1}$$

em que  $p_{(g,i)}$  é a frequência do alelo do microssatélite com  $i$  repetições na geração  $g$  nos cromossomas portadores da mutação,  $q_i$  a frequência do mesmo alelo na população geral,  $\mu$  a taxa de mutação do microssatélite e  $\theta$  a fração de recombinação. Foi considerado um valor de 0,001 para a taxa de mutação ( $\mu$ ) dos microssatélites e para a fração de recombinação  $\theta$  aceitou-se a relação 1cM=1Mb e portanto um valor de

$\theta = 0,00079$  entre o *locus TPI* e o STR (CTTTT)<sub>n</sub> e de  $\theta = 0,00070$  entre o *locus TPI* e o STR (CAG)<sub>n</sub>.

O alelo de microssatélite mais frequente associado a cada uma das mutações foi considerado o alelo original. Para o cálculo da idade das mutações -8G>A e -5G>A, a **equação 1** foi implementada numa folha *Excel* e o número de gerações em que  $p$  igualou a frequência observada do alelo original de cada um dos microssatélites nos cromossomas com a mutação foi considerado a idade da mutação.

#### 4. Análise estatística

Para a análise estatística dos parâmetros que incluíram i) o cálculo de valores de frequências alélicas e de heterozigotia observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), ii) o valor exato de  $P$  (nível de significância = 0,05) para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) (Guo, *et al.*, 1992) e o desequilíbrio de *linkage* (Slatkin, *et al.*, 1996), bem como iii) a inferência de haplótipos a partir dos dados genotípicos com o algoritmo ELB (Excoffier-Laval-Balding) recorreu-se ao *software* Arlequin versão 3.1 (Excoffier, *et al.*, 2005). As frequências genotípicas foram obtidas por contagem direta.

Para testar associações entre os polimorfismos genéticos e os grupos clínicos em estudo utilizaram-se dois testes estatísticos não-paramétricos: i) o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson e o teste exato de Fisher (Uitenbroek, 1997) para testar a existência de associações entre as variáveis; e ii) o cálculo do *odds ratio* e intervalo de confiança (IC) a 95% (MedCalc versão 12.3.0), um modelo multiplicativo para estimar a probabilidade de cada grupo para desenvolver a infeção malárica associada a um grau específico, se um determinado polimorfismo estiver presente.

O teste de Qui-quadrado baseia-se na comparação da distribuição dos dados da amostra (frequências observadas) com a distribuição teórica à qual se supõe pertencer a amostra (frequências esperadas). Os resultados foram todos organizados sob a forma de tabelas de contingência bidimensionais ( $2 \times 2$ ), onde as categorias de uma variável definem as colunas e as categorias da outra variável em estudo definem as linhas. São formuladas duas hipóteses: a hipótese nula ( $H_0$ ), onde as duas variáveis (frequências das linhas e colunas) são independentes entre si (isto é, as frequências observadas não diferem das frequências esperadas), e a hipótese alternativa ( $H_1$ ), onde as duas variáveis

são dependentes (as frequências observadas são diferentes das frequências esperadas), existindo associação entre os grupos (Kirkwood, 1988).

Karl Pearson propôs a seguinte fórmula para medir as possíveis discrepâncias entre proporções observadas e esperadas:  $\chi^2 = \sum \left[ \frac{(fo - fe)^2}{fe} \right]$ , onde  $fo$  é a frequência observada em cada categoria e  $fe$  é a frequência esperada para a categoria correspondente.

O valor  $\chi^2$  obtido depende do nível de significância e do número de linhas e colunas da tabela, sendo por isso necessário considerar o número de graus de liberdade (g.l.), que é dado para uma tabela com L linhas e C colunas, pela equação  $g.l. = (L-1)(C-1)$  (Sokal, *et al.*, 1969 e Kirkwood, 1988). Portanto, o número de g.l. utilizado nas tabelas em estudo foi 1.

No entanto, o teste de Qui-quadrado tem limitações, nomeadamente deverá ser substituído pelo teste exato de Fisher quando o tamanho de duas variáveis independentes é pequeno. Assim, quando foram observadas nas células das tabelas de contingência, frequências esperadas inferiores a 5 foi utilizado este teste que apresenta resultados mais confiáveis.

Estes testes vão determinar a aceitação ou rejeição das hipóteses levantadas, de acordo com o nível de significância utilizado em cada ensaio, tendo sido admitido neste estudo um nível de significância de 5%. Por conseguinte, sempre que o valor de  $P$  (probabilidade) era superior a 0,05 a hipótese nula (não existirem diferenças significativas entre os valores comparados) não era rejeitada. Quando os valores de  $P$  eram inferiores a 0,05, a hipótese nula era rejeitada, considerando-se a existência de diferenças significativas entre os valores comparados.

No cálculo do *odds ratio* fez-se a comparação entre grupos clínicos com infeção malárica grave e não-grave relativamente à presença / ausência do polimorfismo -8 na região promotora do gene *TPI*.

O cálculo do *odds ratio* seguiu a expressão  $OR = \frac{a \times d}{b \times c}$ , onde as letras  $a$ ,  $b$ ,  $c$  e  $d$  correspondem a valores de uma tabela 2×2 semelhante à **Tabela II.16** (Sokal, *et al.*, 1969 e Kirkwood, 1988).

**Tabela II.16: Exemplo de uma tabela  $2 \times 2$  usada no cálculo do *odds ratio*.**

Polimorfismo	Grupos clínicos	
	G	NG
Presença	<i>a</i>	<i>b</i>
Ausência	<i>c</i>	<i>d</i>



## **III - RESULTADOS**

---

## 1. SNPs do gene *TPI*

Foram analisados 5 polimorfismos do gene *TPI*, cujas características estão sumarizadas na **Tabela III.1**, três localizados na região promotora do gene, -5 (A>G), -8 (G>A) e -24 (T>G); um no exão 3, a mutação c.315 (G>A) (Glu104Asp), considerada a mutação mais comum neste gene; e um polimorfismo intragénico 2262 (G>A) observado durante a pesquisa de marcadores no gene *TPI* por SSCP.

**Tabela III.1: Características dos SNPs analisados neste estudo presentes no gene *TPI*.**

Nucleótido	SNPs <sup>a</sup>	Nome HGVS <sup>a</sup>	Localização cromossômica <sup>a</sup>	Região <sup>a</sup>	Alelo ancestral/ alelo derivado <sup>a</sup> (Frequências alélicas <sup>b</sup> )
-5	rs1800200	g.6976688A>G	12:6976688	Promotor	G (0,319)/A (0,681)
-8	rs1800201	g.6976685G>A	12:6976685	Promotor	G (0,858)/A (0,142)
-24	rs1800202	g.6976669T>G	12:6976669	Promotor	Sem dados
Glu104Asp	rs121964845	6978338G>C	12:6978338	Exão 3	Sem dados
2262	rs2071069	g.6979010G>A	12:6979010	Intrão 5-6	G (0,585)/A (0,415)

<sup>a</sup> A referência SNPs, nome HGVS, coordenadas no cromossoma, localização e o estado ancestral dos alelos foram retirados da base de dados *Ensembl*.

<sup>b</sup> As frequências alélicas são referentes à população Africana (AFR) da base de dados *1000 Genomes Project*.

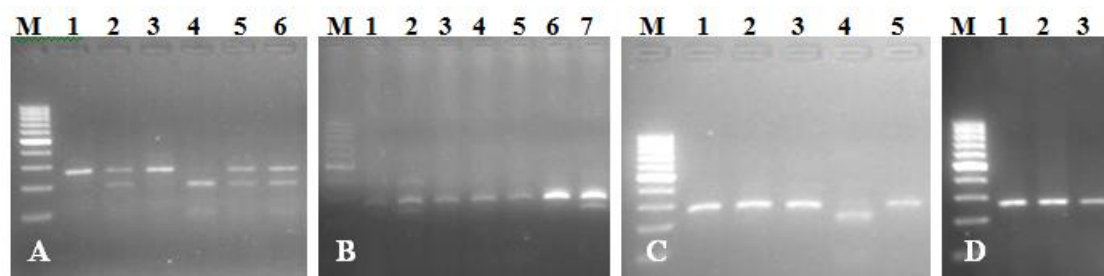
### 1.1 Polimorfismos da região promotora

As variantes alélicas -5 (A>G), -8 (G>A) e -24 (T>G) foram analisadas para o conjunto total de 112 amostras de DNA de indivíduos infetados por *Plasmodium* sp.. Após amplificação por PCR desta região do gene, realizaram-se várias digestões enzimáticas de acordo com o polimorfismo a analisar (ver secção II.3.1) (**Figura III.1**), de modo a obter um perfil genotípico e haplotípico destas variantes para cada indivíduo.

O *locus* -24 revelou-se monomórfico para a totalidade da amostra em análise, todos os indivíduos apresentam o alelo T em homozigotia. A distribuição genotípica dos polimorfismos -5 e -8 encontra-se na **Tabela III.2**, apresentando-se ambos os *loci* em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$  [0,26 e 0,44, respetivamente]).

Foram identificados sete genótipos, quatro deles comuns aos 3 grupos clínicos de malária -5AA/-8GG (frequência média total 46,4%), -5AG/-8GG (35,7%), -5AG/-8GA (10,7%) e -5GG/-8GG (4,5%); os restantes genótipos foram singulares, dois no

grupo dos não-graves -5GG /-8GA (0,9%), -5GG /-8AA (0,9%) e um no grupo dos assintomáticos -5AA /-8GA (0,9%).



**Figura III.1: Identificação das variantes do promotor -5, -8 e -24 por restrição enzimática. Visualização dos genótipos em géis de agarose a 2%.**

**A) Exemplo da caracterização da variante -5 (*TPI* A→G), utilizando a endonuclease *TseI*:** M – marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas); poços 1 e 3: amostras sem mutação (258bp); poços 2, 5 e 6: amostras heterozigóticas (258bp, 188 e 70pb); poço 4: amostra homozigótica (188 e 70pb);

**B e C) Exemplo da caracterização da variante -8 (*TPI* G→A), utilizando a endonuclease *MscI*:** M – marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas); poços B1, B3, B4, B5, B6, C1, C2, C3 e C4: amostras sem mutação (258pb); poços B2 e B7: amostras heterozigóticas [258pb, 191 e 67pb (banda impercetível pois o tamanho é muito reduzido)]; poço C4: amostra homozigótica (191 e 67pb);

**D) Exemplo da caracterização da variante -24 (*TPI* T→G), utilizando a endonuclease *SfcI*:** M – marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas); poços 1, 2 e 3: amostras sem mutação.

**Tabela III.2: Distribuição genotípica das variantes do promotor da TPI na amostra total e nos vários grupos clínicos de malária (Ass – assintomática, NG –não-grave, G – grave)**

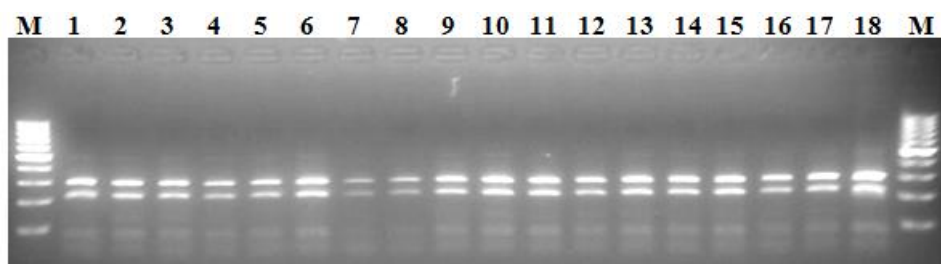
Genótipos	Grupos clínicos de malária			Total
	Ass (%)	NG (%)	G (%)	
-5A -5A /-8G -8G	8 (0,40)	23 (0,45)	21 (0,51)	52
-5A -5G /-8G -8G	7 (0,35)	17 (0,33)	16 (0,39)	40
-5A -5G /-8G -8A	3 (0,10)	7 (0,14)	2 (0,05)	12
-5G -5G /-8G -8G	1 (0,05)	2 (0,04)	2 (0,05)	5
-5A -5A /-8G -8A	1 (0,05)	0 (0,00)	0 (0,00)	1
-5G -5G /-8G -8A	0 (0,00)	1(0,02)	0 (0,00)	1
-5G -5G /-8A -8A	0 (0,00)	1(0,02)	0 (0,00)	1
Total	20	51	41	112

## 1.2 Análise da mutação Glu104Asp

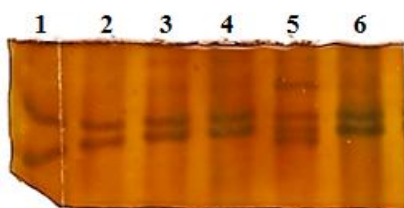
A região do exão 3 foi amplificada por PCR e digerida com a endonuclease *DdeI* (conforme descrito na seção II.3.2) (Schneider, *et al.*, 1995). A digestão foi observada

num gel de agarose a 2% (**Figura III.2**), tendo-se verificado homozigotia do alelo G em todos os indivíduos estudados, ou seja nenhum indivíduo apresentou alterações neste *locus*.

Estes resultados foram validados no rastreio do exão 3 por SSCP (ver secção III.1.3), onde foi observado um perfil electroforético idêntico em todas as amostras analisadas, um perfil *wild-type*, contrastando com o padrão de bandas observado no controlo positivo da mutação Glu104Asp (**Figura III.3**).



**Figura III.2:** Exemplo dos fragmentos obtidos da restrição enzimática com a endonuclease DdeI para a identificação da mutação Glu104Asp no exão 3 do gene *TPI*, segundo a técnica descrita por Schneider *et al.* (1995). Visualização dos genótipos em géis de agarose a 2%. M – marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas); poços 1 a 18: amostras *wild-type* para a mutação glu104Asp. (288pb, 205pb, 81pb e 41pb).



**Figura III.3:** Exemplo dos fragmentos obtidos do rastreio ao exão 3 do gene *TPI* por PCR-SSCP. Visualização em géis de poliacrilamida a 14%.

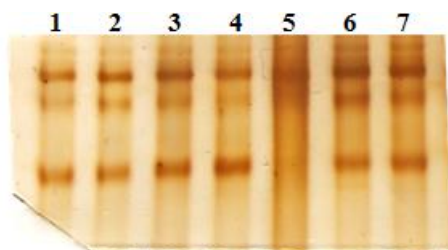
Genótipos da mutação Glu104Asp (G>C) no gel: poços 1 a 4 e 6: amostras *wild-type* para a mutação Glu104Asp; Poço 5: controlo positivo para a mutação Glu104Asp.

### 1.3 Rastreio dos exões do gene *TPI* por PCR - SSCP

No estudo de pesquisa de marcadores de seleção de malária na região do gene humano *TPI* por SSCP (ver secção II.3.3), verificaram-se alterações no perfil de migração electroforético no exão 7 e no intrão 5.

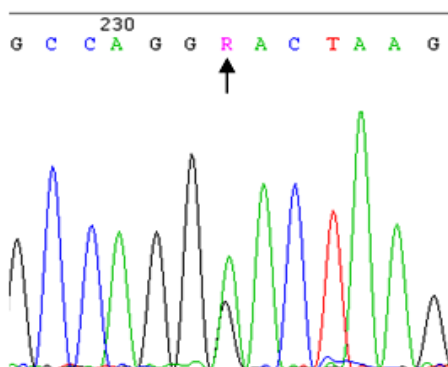
Na análise do exão 7 foi identificado um indivíduo heterozigótico para a mutação rs12692 (G>A) (**Figura III.4**). Este resultado foi confirmado por sequenciação (**Figura III.5**). Aparentemente, pela análise de PCR-SSCP esta mutação foi singular na população em estudo, contudo o padrão migratório observado na **Figura III.4** para a amostra mutada nem sempre foi claro, pondo em causa a normalidade das restantes

amostras para esta mutação. Através da restrição enzimática com a endonuclease BslI confirmou-se a heterozigotia da amostra mutada, tentando-se através deste método obter um perfil genotípico na população em estudo, contudo sem sucesso pois os resultados nem sempre foram consistentes entre restrições sucessivas para as mesmas amostras.



**Figura III.4: Exemplo dos fragmentos obtidos do rastreio ao exão 7 do gene *TPI* por PCR-SSCP. Visualização em géis de poliacrilamida a 10%.**

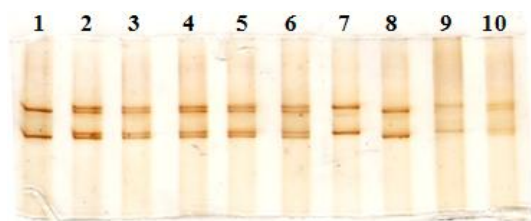
Genótipos da mutação rs12692 no gel: poços 1 a 4 e 6 a 7: amostras *wild-type*; Poço 5: amostra heterozigótica.



**Figura III.5: Parte da sequência genética do exão 7 do gene *TPI* do indivíduo heterozigótico para a mutação rs12692 (G>A). A sequência foi editada pelo software Chromas Lite versão 2.01.**

#### 1.4 Polimorfismo intrónico 2262

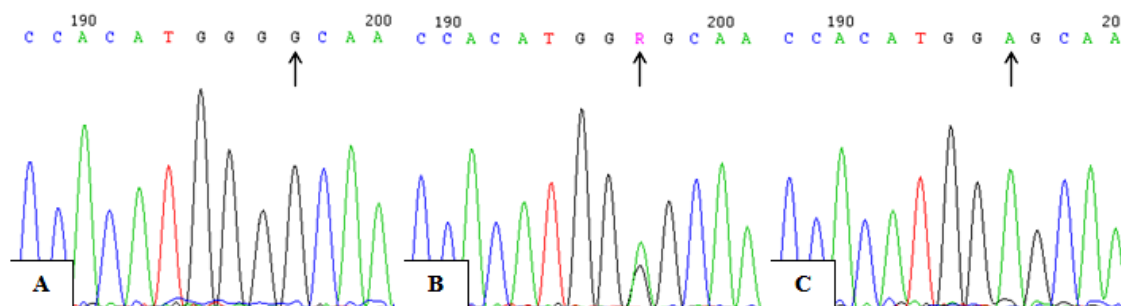
Descrito pela equipa de Arya, R. (Schneider *et al.*, 1996), o polimorfismo no intrão 5, nucleótido 2262 (G>A), foi também observado por PCR-SSCP na população em análise (**Figura III.6**) e confirmado por sequenciação (**Figura III.7**).



**Figura III.6: Exemplo dos fragmentos obtidos do rastreio à fração correspondente entre os exões 5 e 6, do gene *TPI* por PCR-SSCP. Visualização em géis de poliacrilamida a 8%.**

Genótipos da mutação 2262 (G>A) no gel: poços 1 e 8: amostras *wild-type*; poços 2 a 6 e 10: amostras heterozigóticas; poços 7 e 9: amostras homozigóticas.

As frequências alélicas obtidas para este polimorfismo foram de 48% e 52% para o alelo A e G, respectivamente (**Tabela III.3**), encontrando-se este *locus* também em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 0,05$ ).



**Figura III.7: Caracterização da mutação rs12692 (G>A), presente no intrão 5 do gene *TPI*.** A: amostra *wild-type* (nucleótido indicado pela seta); B: amostra heterozigótica; C: amostra homozigótica. As sequências foram editadas pelo *software* Chromas Lite versão 2.01.

## 1.5 Análise estatística

### 1.5.1 Testes de associação

Uma vez que o polimorfismo -24, na região promotora do gene *TPI*, e a mutação Glu104Asp no exão 3 não apresentaram variabilidade genética para o conjunto de amostras em análise, apresentando um comportamento monomórfico, não foram analisados nem considerados nos testes de associação. Assim, apenas os polimorfismos que se revelaram polimórficos: -5, -8 e 2262 foram analisados. As frequências alélicas e haplotípicas (apresentadas nas **Tabelas III.3** e **III.4**, respectivamente) foram analisadas tanto na população total como nos diferentes grupos clínicos de malária.

No *locus* -5, embora o alelo A tenha sido o mais comum (70%), ambos os alelos (A e G) revelaram frequências semelhantes por grupo clínico de malária, sem diferenças estatisticamente significativas nos testes de associação.

No polimorfismo -8 o alelo ancestral (G) foi o mais prevalente no total da amostra com 93% e alelo mutado (A) apresentou uma prevalência total de 7%. Os testes de associação revelaram diferenças estatisticamente significativas na associação do alelo A entre os grupos de malária não-grave e grave (Teste exato de Fisher  $P = 0,032$ ; OR = 0,230; CI<sub>95%</sub>: 0,049-1,081; **Tabela III.3**).

As frequências alélicas do polimorfismo 2262 são semelhantes tanto na amostra total, 48% para o alelo A e 52% para o G, como entre grupos clínicos. Os restantes

testes de associação realizados não revelaram diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

**Tabela III.3: Frequências alélicas dos SNPs em estudo no gene *TPI* em doentes de malária** (Ass – assintomática, NG – não-grave, G – grave).

SNPs	Frequências alélicas			Total (n=112)	Teste de Associação ( <i>P</i> -value)		
	Ass (2n=40)	NG (2n=102)	G (2n=82)		Ass vs NG	Ass vs G	NG vs G
<b>-5 ;</b>							
A	28 (0,70)	70 (0,69)	60 (0,73)	0,70			
G	12 (0,30)	32 (0,31)	22 (0,27)	0,30	0,874	0,714	0,501
HWE <i>P</i> -value	0,62	0,75	0,69	0,26			
Ho	0,50	0,47	0,44	0,46			
He	0,43	0,44	0,40	0,42			
<b>-8 ;</b>							
G	36 (0,90)	92 (0,90)	80 (0,98)	0,93			
A	4 (0,10)	10 (0,10)	2 (0,02)	0,07	0,243 <sup>a</sup>	0,075 <sup>a</sup>	<b>0,032<sup>a,b</sup></b>
HWE <i>P</i> -value	1,00	0,38	1,00	0,44			
Ho	0,20	0,16	0,05	0,13			
He	0,19	0,18	0,05	0,13			
<b>2262 ;</b>							
G	22 (0,55)	51 (0,50)	44 (0,54)	0,52			
A	18 (0,45)	51 (0,50)	38 (0,46)	0,48	0,592	1,000	0,622
HWE <i>P</i> -value	0,65	1,00	0,53	0,85			
Ho	0,60	0,49	0,44	0,49			
He	0,51	0,51	0,50	0,50			

<sup>a</sup> Teste exato de Fisher

<sup>b</sup> OR = 0,230; CI<sub>95%</sub>: 0,049-1,081

A **Tabela III.4** descreve a análise haplotípica entre os SNPs do gene *TPI* em estudo. Observaram-se seis haplótipos distintos, quatro deles comuns a todos os grupos clínicos: -5A/-8G/2262A (AGA), AGG, GGG e GAG; o conjunto AAG observado apenas no grupo dos indivíduos assintomáticos e o haplótipo GGA apenas identificado nos grupos de malária grave e não-grave. A combinação haplotípica GAG foi ímpar nos testes de associação efetuados entre os diferentes haplótipos gerados e os grupos clínicos de malária, mostrando uma diferença estatisticamente significativa quando comparada nos grupos de malária grave e não-grave (Teste exato de Fisher  $P = 0,032$ ; OR = 0,230; CI<sub>95%</sub>: 0,049-1,081; **Tabela III.4**).

**Tabela III.4: Frequências haplotípicas entre os SNPs em estudo no gene *TPI* em doentes de malária** (Ass – assintomática, NG – não-grave, G – grave).

Haplótipo	Frequências haplotípicas							Teste de Associação ( <i>P</i> -value)		
	-5	-8	2262	Ass	NG	G	Total	NG vs G	G vs Ass	NG vs Ass
H1	A	G	G	0,225	0,225	0,280	0,246	0,392	0,513	1,000
H2	A	G	A	0,450	0,461	0,452	0,455	1,000	1,000	1,000
H3	A	A	G	0,025	0,000	0,000	0,004	-----	0,328 <sup>a</sup>	0,282 <sup>a</sup>
H4	G	A	G	0,075	0,098	0,024	0,067	<b>0,032<sup>a, b</sup></b>	0,158 <sup>a</sup>	0,242 <sup>a</sup>
H5	G	G	G	0,225	0,177	0,232	0,205	0,353	1,000	0,507
H6	G	G	A	0,000	0,039	0,012	0,023	0,209 <sup>a</sup>	0,672 <sup>a</sup>	0,269 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Teste exato de Fisher

<sup>b</sup> OR = 0,230; CI<sub>95%</sub>: 0,049-1,081

### 1.5.2 Desequilíbrio de *linkage*

O estudo do desequilíbrio de *linkage* entre as comparações de *loci* par a par possíveis e os grupos clínicos de malária em estudo encontra-se descrito na **Tabela III.5**. O grupo de indivíduos com infeção malárica não-grave apresenta desequilíbrio de *linkage* significativo entre todos os pares: -8 e -5, -8 e 2262, e -5 e 2262. Revelaram também desequilíbrio de *linkage* significativo os *loci*: -5 e 2262 nos grupos da infeção malárica assintomática e grave.

**Tabela III.5: Desequilíbrio de *linkage* entre os SNPs estudados nos diferentes grupos clínicos de malária** (Ass – assintomática, NG – não-grave, G – grave).

SNPs		Desequilíbrio de <i>linkage</i> ( <i>P</i> -value)		
<i>Locus 1</i>	<i>Locus 2</i>	Ass	NG	G
-8	-5	0,069	<b>0,000</b>	0,072
-8	2262	0,114	<b>0,001</b>	0,213
-5	2262	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>

## 2. Microsatélites

Foram estudados três microsatélites localizados em regiões adjacentes ao gene *TPI* (**Tabela II.13**), de forma a estimar a associação haplotípica dos polimorfismos do promotor -5 e -8 aos microsatélites. Nesta análise foram excluídas as amostras que falharam a amplificação para algum *locus*.



## 2.1 Repetição pentanucleotídica (CTTTT)<sub>n</sub>

Foram detetados onze alelos para o microssatélite (CTTTT)<sub>n</sub>, variando em tamanho de 137 a 187pb. São observados 17 haplótipos associados ao polimorfismo -5 e 16 conjugados com o polimorfismo -8 (**Tabela III.6**).

As duas conjugações haplotípicas demonstram grande diversidade genética, sendo associados ao alelo ancestral G da variante -5 sete alelos e dez à variante A; enquanto o polimorfismo -8 apresenta onze alelos associados ao nucleótido ancestral G e cinco conjugados à mutação -8A, que apresenta baixas frequências haplotípicas, em comparação com as demais combinações.

**Tabela III.6:** Haplótipos, gerados pela associação do microssatélite (CTTTT)<sub>n</sub> e os polimorfismos -5 e -8 da região promotora do gene *TPI* e respectivas frequências absolutas.

Haplótipo	Tamanho do alelo (pb) / -5	n	Tamanho do alelo (pb) / -8	n
1	137 A	41	137 G	48
2	167 A	24	167 G	34
3	142 A	19	152 G	21
4	167 G	16	142 G	19
5	152 A	12	162 G	13
6	182 A	10	172 G	11
7	152 G	10	182 G	10
8	137 G	10	147 G	7
9	162 A	9	167 A	6
10	162 G	9	162 A	5
11	172 G	8	157 G	5
12	147 A	6	137 A	3
13	157 A	5	152 A	1
14	172 A	3	187 A	1
15	187 A	2	177 G	1
16	147 G	1	187 G	1
17	177 G	1		

## 2.2 Repetição trinucleotídica (CAG)<sub>n</sub>

O microssatélite (CAG)<sub>n</sub> foi associado a doze alelos, variando entre 197 a 239pb.

A análise associativa deste microssatélite com os polimorfismos do promotor -5 e -8 (**Tabela III.7**) não apresentou uma diversidade genética semelhante entre as duas

conjugações, como observado na análise haplotípica com o microssatélite (CTTTT)<sub>n</sub>, observando-se 19 haplótipos associados ao polimorfismo -5 e 14 ao polimorfismo -8. Esta análise denota ainda maiores divergências entre a quantidade de haplótipos ligados à variante -8A, que se associa apenas a dois alelos 200 e 212, podendo conjecturar-se uma idade mais recente para esta mutação, em relação à variante -5 que apresenta doze alelos para a variante -5A e sete para a -5G.

**Tabela III.7 Haplótipos, gerados pela associação do microssatélite (CAG)<sub>n</sub> e os polimorfismos -5 e -8 da região promotora do gene *TPI* e respectivas frequências absolutas.**

Haplótipo	Tamanho do alelo (pb) / -5	n	Tamanho do alelo (pb) / -8	n
1	212 A	44	209 G	55
2	209 A	35	212 G	48
3	209 G	20	215 G	19
4	215 A	19	218 G	17
5	200 G	14	206 G	13
6	206 A	11	200 G	12
7	212 G	11	200 A	9
8	218 A	9	212 A	7
9	218 G	8	197 G	5
10	200 A	7	227 G	5
11	227 A	5	203 G	2
12	197 A	4	221 G	2
13	203 A	2	233 G	1
14	206 G	2	239 G	1
15	233 A	1		
16	221 A	1		
17	239 A	1		
18	197 G	1		
19	221 G	1		

### 2.3 Repetição trinucleotídica (CTA)<sub>n</sub>

Foram observados onze alelos entre 310 a 349pb para o microssatélite (CTA)<sub>n</sub>, compondo 17 haplótipos conjugados com o polimorfismo -5 e 15 haplótipos com a mutação -8 (**Tabela III.8**). Tal como nas análises haplotípicas anteriores foi a conjugação deste microssatélite com a mutação -8 que obteve menor número de haplótipos sendo a variante -8A a que apresenta menor diversidade genética.

**Tabela III.8: Haplótipos, gerados pela associação do microsatélite (CTA)<sub>n</sub> e os polimorfismos -5 e -8 da região promotora do gene *TPI* e respectivas frequências absolutas.**

Haplótipo	Tamanho do alelo (pb) / -5	n	Tamanho do alelo (pb) / -8	n
1	322 A	78	322 G	100
2	322 G	32	337 G	26
3	337 A	19	331 G	18
4	331 A	17	340 G	17
5	340 A	11	322 A	10
6	340 G	10	328 G	7
7	328 A	7	343 G	6
8	337 G	6	340 A	4
9	343 G	5	334 G	4
10	331 G	2	316 G	2
11	334 A	2	319 G	2
12	316 A	2	331 A	1
13	349 G	1	337 A	1
14	319 G	1	310 G	1
15	319 A	1	349 G	1
16	343 A	1		
17	310 A	1		

#### 2.4 Desequilíbrio de *linkage* entre os SNPs e microsatélites

A **Tabela III.9** apresenta o desequilíbrio de *linkage* entre os polimorfismos -5, -8 e 2262 e os microsatélites estudados, (CTTTT)<sub>n</sub> e (CAG)<sub>n</sub>, de acordo com o grupo clínico de malária.

Das 6 comparações possíveis, par a par, apenas uma não é significativa para o desequilíbrio de *linkage* em todos os grupos analisados, entre os *loci*: -8 e (CTTTT)<sub>n</sub>, observando-se uma perda de desequilíbrio de *linkage*, resultado de um maior número de haplótipos gerados. As comparações entre os *loci*: -8 e (CAG)<sub>n</sub>, -5 e (CTTTT)<sub>n</sub>, e 2262 e (CTTTT)<sub>n</sub> foram significativas para o desequilíbrio de *linkage* apenas no grupo da infecção malárica não-grave, enquanto os *loci*: -5 e (CAG)<sub>n</sub>, e 2262 e (CAG)<sub>n</sub> apenas foram significativos no grupo dos indivíduos com malária grave.

**Tabela III.9: Desequilíbrio de *linkage* entre SNPs e STRs nos diferentes grupos clínicos de malária** (Ass – assintomática, NG – não-grave, G – grave).

SNPs	STR	Desequilíbrio de <i>linkage</i> ( <i>P</i> -value)		
		Ass	NG	G
-8	(CTTTT) <sub>n</sub>	0,613	0,582	0,569
	(CAG) <sub>n</sub>	0,888	<b>0,004</b>	0,509
-5	(CTTTT) <sub>n</sub>	0,080	<b>0,037</b>	0,084
	(CAG) <sub>n</sub>	1,000	0,092	<b>0,008</b>
2262	(CTTTT) <sub>n</sub>	0,505	<b>0,000</b>	0,674
	(CAG) <sub>n</sub>	0,682	0,078	<b>0,044</b>

### 3. Datação dos polimorfismos -5 e -8 do promotor do gene *TPI*

Quando uma mutação surge, fica inicialmente associada a um único haplótipo (haplótipo original) e, portanto, em desequilíbrio de ligação com quaisquer marcadores polimórficos, nomeadamente microssatélites, localizados nesse cromossoma. Com o passar do tempo, vão sendo produzidos novos arranjos haplotípicos em consequência quer da recombinação que ocorre entre os *loci*, quer da taxa de mutação relativamente elevada dos microssatélites. Deste modo, o grau de desequilíbrio observado entre a mutação e marcador polimórfico, que originalmente era de 100%, vai decaindo ao longo do tempo, podendo este decaimento ser utilizado para estimar a antiguidade da mutação.

Dos três microssatélites estudados (**Tabela II.13**), apenas dois foram usados para estimar a antiguidade das mutações -5 e -8: (CTTTT)<sub>n</sub> e (CAG)<sub>n</sub>, uma vez que o (CTA)<sub>n</sub> não se encontrava em equilíbrio de Hardy-Weinberg (**Tabela III.10**), e sendo esta uma condição necessária ao cálculo da frequência do alelo original em cada geração, foi excluído do estudo.

**Tabela III.10: Estudo da diversidade genética de cada microssatélite através do valor de equilíbrio de Hardy-Weinberg e respetivos valores de heterozigotia observada e esperada.**

Microssatélite	n	Ho	He	HWE ( <i>P</i> -value)
(CTTTT) <sub>n</sub>	93	0,763	0,841	0,265
(CAG) <sub>n</sub>	98	0,765	0,812	0,242
(CTA) <sub>n</sub>	100	0,270	0,660	0,000

Para datar a mutação -8G>A foi necessário ter em conta que o alelo -8A surge em dois haplótipos quando associado ao polimorfismo -5, tendo sido encontrados neste estudo os quatro haplótipos possíveis: -5G-8G, -5A-8G, -5G-8A e também o haplótipo -5A-8A. Assim, foi estimada a antiguidade da mutação -5G>A, assumindo o alelo G como ancestral dado ser este o único alelo encontrado em primatas, e da mutação -8G>A considerando as possibilidades de origem única e de origem recorrente nos dois haplótipos -5G-8G e -5A-8G (**Tabela III.11**).

**Tabela III.11: Antiguidade estimada para os polimorfismos -5 e -8 (nos *backgrounds* -5A-8G e -5G-8G) e respetivos desvios-padrão, com base na variação acumulada para cada microssatélite (CTTTT)<sub>n</sub> e (CAG)<sub>n</sub>, e a média entre estas idades calculadas em gerações e anos. Foi considerado o valor de 25 anos por geração.**

SNPs	(CTTTT) <sub>n</sub>	(CAG) <sub>n</sub>	Idade da mutação <sup>a</sup>	
	Gerações	Gerações	Gerações	Anos
-5 (G>A)	719 (661-784)	857 (782-943)	788 (721-863)	19 700 (18037-21587)
-8 (G>A) (origem única)	762 (566-1071)	384 (282-511)	573 (424-791)	14 325 (10600-19775)
-8 (G>A) (background -5G-8G)	695 (512-978)	424 (310-569)	559 (411-773)	13 987 (10275-19337)
-8 (G>A) (background -5A-8G)			Sem dados	

<sup>a</sup> Média das idades estimadas pela associação dos SNPs aos dois microssatélites.

A antiguidade estimada para as mutações depende do microssatélite utilizado para a calcular, observando-se grande divergência entre eles. Quando considerado o microssatélite (CTTTT)<sub>n</sub>, a mutação -5G>A revela uma idade inferior, com uma diferença de 138 gerações, comparada com a idade estimada a partir do microssatélite (CAG)<sub>n</sub>; contrariamente, na mutação -8G>A, observa-se uma idade menor, quando associada ao marcador (CAG)<sub>n</sub>, com uma diferença de 378 gerações em relação ao microssatélite (CTTTT)<sub>n</sub>, no haplótipo -5A-8G.

A antiguidade do polimorfismo -5G>A, se considerarmos a média das idades estimadas nos dois microssatélites, foi de 788 (721-863) gerações, a que corresponde uma idade de 19 700 (18 037-21 587) anos, assumindo o valor de 25 anos por geração.

---

Para a mutação -8G>A, caso tenha uma origem única, a idade estimada foi de 573 (424-791) gerações, correspondendo a 14 325 (10 600-19 775) anos. Se, por outro lado, ocorreu duas vezes, por mutação recorrente, a antiguidade estimada para o primeiro evento mutacional (no haplótipo -5G-8G), foi de 559 (411-773) gerações, equivalendo a 13 987 (10 275-19 337) anos. A datação do segundo evento (no haplótipo -5A-8G) não foi possível devido à existência de apenas um único haplótipo -5A-8A associado a cada microssatélite.

## **IV - DISCUSSÃO DE RESULTADOS**

---

Os polimorfismos genéticos humanos selecionados pela pressão exercida pela malária envolvem sobretudo proteínas estruturais específicas (tais como o antigénio Duffy e o grupo sanguíneo O), hemoglobinopatias (como a hemoglobinas S e C, e as talassémias) e enzimas eritrocitárias (como a deficiência em G6PD e, mais recentemente descrita, a deficiência em PK).

A deficiência em TPI é uma enzimopatia que afeta o metabolismo energético, atingindo sobretudo os eritrócitos que dependem unicamente da glicólise para gerar ATP. Apesar de não existir na literatura uma associação desta patologia com a malária, a elevada frequência de determinadas mutações em indivíduos de origem Africana, pressupõe essa possibilidade (Schneider, *et al.*, 1998; Humphries, *et al.*, 1999).

As prevalências observadas neste estudo para cada polimorfismo da região promotora do gene *TPI* (-5A>G, -8G>A e -24T>G) foram similares às anteriormente descritas para indivíduos de origem Africana (Manco, *et al.*, 2009 e Humphries, *et al.*, 1999), corroborando a elevada frequência registada para estas mutações no continente Africano.

O polimorfismo no *locus* -5 apresentou uma variabilidade genética superior ao polimorfismo no *locus* -8 ( $H_e = 0,42$  vs 0,13, respetivamente), apoiando os resultados de Humphries, *et al.* (1999), que descreve uma distribuição geográfica e frequências genotípicas superiores, nomeadamente nas populações Africana e Oriental.

A variante -8A, com uma frequência de 7% (*versus* 10% relatada por Manco, *et al.*, (2009) englobando dados de 3 populações de África subsariana), foi encontrada em 4 genótipos distintos: -5A-5G/-8G-8A; -5G-5G/-8G-8A; -5G-5G/-8A-8A e -5A-5A/-8G-8A. Esta última distribuição genotípica, observada apenas num único indivíduo diagnosticado como assintomático para a infeção malárica (por *P. falciparum*), apesar de já ter sido relatada por Humphries, *et al.* (1999) como um genótipo raro e aparentemente confinado à população Africana, não foi encontrado no estudo de Manco, *et al.* (2009).

O *locus* -24 revelou ser monomórfico para o alelo T, igualando os resultados obtidos por Manco, *et al.* (2009). Esta alteração mutacional resulta numa diminuição da atividade da TPI que pode contribuir para uma deficiência grave desta enzimopatia (Schneider, *et al.*, 1998), o que explica o registo de baixas, ou mesmo nulas, frequências



para este polimorfismo na população geral (Schneider, *et al.*, 1998; Humphries, *et al.*, 1999 e Manco, *et al.*, 2009).

Para o polimorfismo intrônico 2262 registou-se a frequência de 0,48 para o alelo A, um valor semelhante ao descrito na literatura para a população Africana (41%; *1000 Genomes Project*).

Os testes de associação realizados entre os 3 grupos clínicos de malária, baseados nas frequências alélicas das alterações -5 e -8 do promotor da TPI, demonstraram diferenças estatisticamente significativas para a mutação -8A entre os grupos grave e não-grave ( $P = 0,032$ ). Este resultado pode ser indicativo de uma vantagem seletiva associada a esta variante polimórfica, aparentando estar relacionada com a resistência à severidade da infeção malárica.

Na população estudada, 53,6% dos indivíduos apresentam genótipos com variações polimórficas na região promotora do gene. Segundo Schneider, *et al.* (1998) a diminuição da atividade da TPI em eritrócitos parece ser atribuída às mutações -8A e -24G, observando-se uma sucessiva diminuição da atividade enzimática associada aos genótipos  $-5A-5G/-8G-8G/-24T-24T > -5A-5G/-8G-8A/-24T-24T > -5A-5G/-8G-8A/-24T-24G > -5G-5G/-8A-8A/-24T-24T$ . Humphries, *et al.* (1999b) demonstraram uma clara associação entre a mutação -8A e a redução da atividade da TPI eritrocitária *in vivo*, de sensivelmente 10% e 24% para indivíduos heterozigóticos e homozigóticos, respetivamente.

A mutação -5, isoladamente, não é responsável por diferenças significativas na atividade desta enzima em eritrócitos (Humphries, *et al.*, 1999b).

A análise das frequências haplotípicas encontradas na população em estudo englobando os polimorfismos -5 e -8 do promotor e a alteração no nucleótido 2262 do intrão 5 do gene *TPI* demonstraram diferença estatisticamente significativa para o haplótipo GAG (-5, -8, 2262) entre os grupos grave e não-grave ( $P = 0,032$ ), sugerindo novamente uma relação de proteção contra a infeção malárica, conferida pela mutação -8A quando associada a este haplótipo. Schneider, *et al.* (1998) compararam grupos haplotípicos com baixa e alta atividade da TPI, divididos por quartis, registando maior proporção de cromossomas -5G-8A no quartil correspondente a uma atividade enzimática menor.

Este consenso de ideias permite conjecturar a hipótese de que a mutação -8A, associada à redução da atividade enzimática de TPI em eritrócitos, pode conferir proteção à malária, sendo esta vantagem seletiva a responsável pela disseminação desta variante polimórfica nas populações Africanas.

A pesquisa dos desequilíbrios de *linkage* entre os vários SNPs estudados no gene *TPI* vem apoiar esta hipótese, observando-se desequilíbrio de *linkage* entre os *loci* -8 e -5, e -8 e 2262 apenas no grupo dos indivíduos com malária não-grave. Estes dados suportam a hipótese da pressão seletiva exercida pela malária no genoma humano sobre a mutação -8A, sendo no entanto expectável o valor de desequilíbrio significativo entre os *loci* -5 e -8, uma vez que distam em três nucleótidos apenas.

Existe também um desequilíbrio significativo entre os *loci* -5 e 2262 em todos os grupos clínicos de malária. Este resultado de desequilíbrio significativo entre os *loci* supracitados foi também obtido por Humphries, *et al.* (1999), em todas as populações estudadas e baseando-se no padrão de haplótipos obtidos, atribui-lhes uma origem ancestral comum, possivelmente em África e antecedendo a dispersão das populações humanas modernas. A origem ancestral destes *loci* (-5 e 2262) é corroborada pelos valores de desequilíbrio de *linkage* entre estes *loci* separadamente e os STRs em estudo (CTTTT<sub>n</sub> e CAG<sub>n</sub>), verificando-se um desequilíbrio nas mesmas comparações dentro dos mesmos grupos (**Tabela III.9**).

As comparações entre a mutação -8 e os STRs evidenciaram significância apenas na associação entre os *loci* -8 e (CAG)<sub>n</sub> no grupo de indivíduos com infeção malárica não-grave. O alelo -8A foi associado somente a dois dos catorze alelos encontrados para o microssatélite (CAG)<sub>n</sub>, aludindo a existência de desequilíbrio. Curiosamente, os *loci* -8 e (CTTTT)<sub>n</sub> parecem estar em equilíbrio de *linkage*, no entanto este equilíbrio não é observado na comparação entre os *loci* -5 e (CTTTT)<sub>n</sub>, o que seria expectável, uma vez que apenas 3 nucleótidos separam estes SNPs, pressupondo-se um resultado de desequilíbrio de *linkage* semelhante entre estas comparações.

A diversidade de haplótipos observada entre as variantes do promotor do gene *TPI*, e a sua distribuição geográfica cosmopolita (Humphries, *et al.*, 1999), gerou discussão na comunidade científica nomeadamente ao nível dos eventos genéticos que poderão ter contribuído para esta variação haplotípica. A recombinação genética parece pouco provável, devido à curta distância entre os nucleótidos responsáveis por esta

variação no promotor. Baseando-se nas frequências haplotípicas encontradas, Humphries *et al.* (1999) sugeriram a hipótese de terem ocorrido mutações sucessivas no haplótipo tido como ancestral para *Homo sapiens* (-5G-8G-24G), obtido através da sequência genética do gene *TPI* em chimpanzé (Craig, *et al.*, 1991).

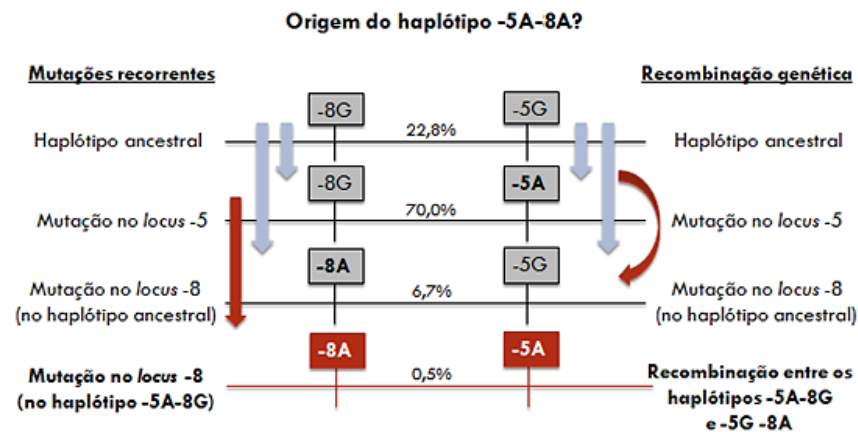
O motivo que desencadeou estes eventos mutacionais no genoma humano é ainda controverso. Schneider, *et al.* (1998) defendem a hipótese de vantagem seletiva para a sobrevivência humana, baseada na associação entre a elevada incidência polimórfica com a moderada redução da atividade da TPI. Todavia, Humphries, *et al.* (1999) sustentam a hipótese da diversificação haplotípica observada ter precedido a separação entre as populações Africanas e não-Africanas, que terá ocorrido à aproximadamente 100 000 anos (Flint, *et al.*, 1993), baseando-se na extensa variação alélica no *locus* (CTTTT)<sub>n</sub> entre os haplótipos relatados para a região promotora do gene *TPI*, estando este *locus* em equilíbrio de *linkage* com os vários haplótipos que divergem do ancestral.

Neste trabalho, procedemos ainda a uma tentativa de obter informações sobre a antiguidade dos polimorfismos -5G>A e -8G>A (**Tabela III.11**). A idade estimada das duas variantes revelou ser inferior ao período de dispersão das populações humanas modernas originário de África, rejeitando a hipótese proposta por Humphries, *et al.* (1999). Ainda assim, a mutação -5A (idade estimada: ~20 mil anos) mostrou ser mais antiga do que a mutação -8A (idade estimada: ~14 mil anos). As frequências haplotípicas entre os microssatélites estudados e estes dois polimorfismos apoiam esta conclusão, uma vez que a mutação -5A está associada a uma variação intra-alélica superior (maior idade) para os *loci* (CTTTT)<sub>n</sub> (0,631 *vs* 0,501) e (CAG)<sub>n</sub> (0,613 *vs* 0,481). A idade agora estimada para a mutação -5G>A, que aponta para uma origem da mutação numa fase posterior à saída e dispersão do homem moderno para fora de África, é difícil de conciliar com a distribuição de frequências observada para o alelo -5A em populações não-africanas, nomeadamente de origem Europeia (Humphries *et al.*, 1999; Manco *et al.*, 2008). Não podemos excluir, no entanto, a possibilidade de no cálculo efetuado, as taxas de mutação e/ou recombinação consideradas para os microssatélites se encontrarem sobrestimadas e portanto a idade da variante ser superior.

A idade da mutação -8A foi calculada à luz das duas hipóteses possíveis para a origem do haplótipo -5A-8A (**Figura IV.1**). A primeira hipótese, referida como a menos provável, considera uma origem única da mutação no haplótipo ancestral -5G-8G e posterior recombinação genética entre os *loci* -5 e -8 nos haplótipos -5G-8A e -5A-8G. Considerando esta possibilidade de origem única, a idade estimada para o evento mutacional -8G>A foi de 14 325 (10 600 - 19 775) anos. A diferença de idade em número gerações calculada para os dois STRs individualmente, é de 378 gerações, um valor bastante elevado que origina variações na antiguidade estimada para a mutação -8A, entre 9 600 (7 500 – 12 775) anos quando associada ao microsatélite (CAG)<sub>n</sub> e 19 050 (14 150 – 26 775) anos quando considerado o microsatélite (CTTTT)<sub>n</sub>.

Apesar de a hipótese de uma origem única para esta mutação e, consequentemente, um evento de recombinação entre estes *loci* ser pouco provável dada a sua proximidade, o desequilíbrio de *linkage* entre os *loci* -5 e -8 foi apenas observado no grupo dos indivíduos com infeção malárica não-grave. Dada a contiguidade destes polimorfismos, esperar-se-ia detetar este desequilíbrio na população total. Outro facto que apoia esta hipótese são os resultados díspares de desequilíbrio de *linkage* entre cada *locus* -5 e -8, conjugados com os STRs, que se esperariam semelhantes devido, mais uma vez, à sua proximidade.

A segunda hipótese sugere a possibilidade de se obter o haplótipo -5A-8A por mutação recorrente e portanto existirem dois eventos mutacionais -8G>A. A idade estimada para o primeiro evento mutacional -8G>A no haplótipo ancestral -5G-8G foi de aproximadamente 13 987 (10 275 – 19 337) anos, quando combinada a informação dos dois microsatélites (uma idade ligeiramente inferior à estimada para a hipótese de origem única, 14 325 anos). Para o segundo evento mutacional, ocorrido no haplótipo -5A-8G, a datação foi inexequível, o que indica uma idade muito recente, não tendo havido tempo suficiente para acumular variação ou eventos de recombinação nos microsatélites.



**Figura IV.1: Hipóteses extrapoladas para o surgimento do haplótipo -5A-8A na região promotora do gene *TPI*: mutações recorrentes *versus* recombinação genética, com base nas frequências de cada haplótipo na população em estudo.**

Achados históricos e arqueológicos indicam que a malária tem tido um impacto significativo nos humanos desde há sensivelmente 10 000 anos, coincidente com a origem e expansão da agricultura no Médio-Oriente e em África. Nessa altura, a população africana experimentava mudanças dramáticas tanto a nível ambiental como comportamental, passando de caçadores-coletores a agricultores, tendo dado início à transmissão da malária ao humano. A introdução da agricultura de derrube e queima na região oeste de África desencadeou a desflorestação de zonas tropicais, criando desta forma, condições favoráveis à multiplicação e expansão de *Anopheles gambiae*, o principal vetor de *P. falciparum*. A propagação desta prática agrícola proporcionou o aumento de coleções/reservatórios de água expostos à luz solar, criando potenciais locais de criadouro para o vetor, o que terá contribuído para a crescente densidade populacional deste mosquito em África. O desenvolvimento agrícola contribuiu, por outro lado, para o aumento da densidade populacional humana, facilitando a expansão da malária. (Armélagos, *et al.*, 1996; Uneke, 2009 e Tishkoff, *et al.*, 2001).

A idade calculada para mutação -8A (~14 000 anos) excede o período de 10 000 anos, considerado como início do impacto da malária nas populações humanas, no entanto as idades de 9 600 anos (para origem única) ou 10 600 anos (para mutação recorrente) obtidas pela associação ao locus (CAG)<sub>n</sub> encontram-se dentro deste período, o que não descarta a hipótese de ter existido uma seleção desta mutação como uma

vantagem de sobrevivência humana, neste caso por um efeito protetor contra a malária. Do mesmo modo, a idade inferior (~10 000 anos) para a média da antiguidade estimada para os dois microssatélites, 14 325 (10 600 – 19 775) anos, é também compatível com o aparecimento da variante -8A durante a origem e difusão da agricultura em África.

A mutação Glu104Asp, a mais comum na deficiência em TPI, não foi encontrada na amostra analisada. Uma possível justificação é a origem Europeia da maioria dos casos reportados para esta mutação, tendo sido proposta uma origem única para esta mutação na Europa ocidental, dispersando-se para outros continentes através da expansão e migração das populações (Arya, *et al.*, 1997). Uma vez não observada neste estudo, a mutação Glu104Asp parece ser ainda pouco prevalente na população de origem Africana.

A análise do microssatélite (CTA)<sub>n</sub> apresentou um défice de heterozigóticos e, consequentemente um desvio significativo ( $P < 0,05$ ) do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Diversos fatores podem reduzir a heterozigotia, podendo significar que este *locus* está sob ação de seleção ou apresenta alelos nulos, devido a polimorfismos nos locais de hibridação dos oligonucleótidos. Este microssatélite está localizado no gene que codifica a proteína-tirosina fosfatase, não recetora tipo 6 (PTPN6) da família das tirosinas fosfatases (PTP), moléculas de ligação que regulam vários processos celulares, incluindo a proliferação e a diferenciação celular, o ciclo mitótico e a transformação oncogénica. A proteína PTPN6 é expressa primeiramente nas células hematopoiéticas e funciona como um importante regulador das múltiplas vias de sinalização nestas células. A metilação do promotor do gene *PTPN6*, com consequente silenciamento deste gene, foi detetada em vários tipos de leucemias e linfomas. A perda de heterozigóticos nos microssatélites analisados junto ao gene *PTPN6* foi reportada em 79% dos casos de leucemia linfoblástica aguda, sugerindo ser um gene supressor de tumores (Oka, *et al.*, 2002).

O *locus* (CAG)<sub>n</sub> está localizado no gene que codifica a proteína atrofina 1 (ATN1). Esta proteína encontra-se no sistema nervoso e está associada a uma doença neurodegenerativa, a atrofia dentatorubral-pallidoluisian (DRPLA), transmitida de modo autossómico dominante, e causada pela síntese de proteínas mutantes com elevado número de repetições do triplete CAG (54-79 repetições) (Yamada, *et al.*, 2010). A acumulação intracelular desta proteína mutante ocorre no sistema nervoso

central, inibindo a atividade de G3PD (Shiozawa, *et al.*, 2003). O número máximo de repetições deste tripleto observado na amostragem em estudo foi de 26 repetições, apresentando todos os indivíduos a proteína ATP1 normal.

A inibição de vias metabólicas ou enzimas envolvidas em processos cruciais para a sobrevivência do parasita representam potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos. A carência de um ciclo dos ácidos tricarboxílicos funcional em *P. falciparum* torna-o exclusivamente dependente da glicólise para a obtenção de ATP. O consumo de glucose nos eritrócitos parasitados é cerca de 50 a 100 vezes maior comparando com eritrócitos não infetados (Subbayya, *et al.*, 1997).

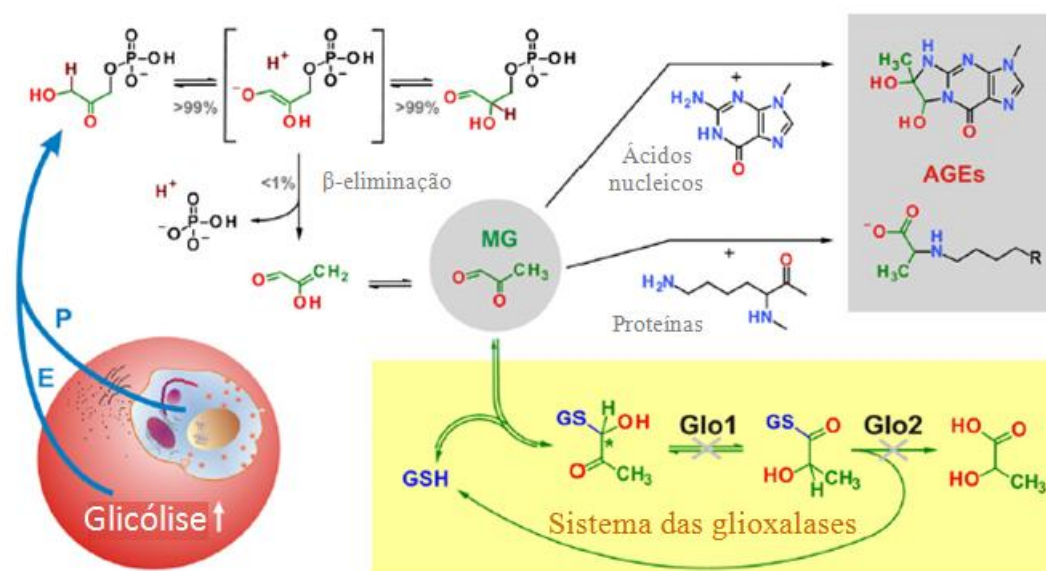
Ritter, *et al.* (1993) reportaram a existência de uma resposta humoral anti-TPI (IgM), desencadeada durante a infecção malárica, resultando numa anemia hemolítica crônica. A presença destes auto-anticorpos foi observada apenas em infecções por *P. falciparum* graves, sendo a produção destes anticorpos autolimitada e diretamente associada com a severidade da anemia, uma vez que decresce com a diminuição de lactato desidrogenase (LDH) e com o aumento da hemoglobina no soro. Este facto sugere a hipótese da TPI estar localizada na membrana eritrocitária encontrando-se parcialmente exposta, o que permite a estimulação da produção de anticorpos anti-TPI. As propriedades de ligação à membrana eritrocitária pelas enzimas glicolíticas é uma característica que parece ter um papel importante na infecciosidade de certos parasitas, representando potenciais alvos no desenho de novas estratégias de intervenção terapêutica (Subbayya, *et al.*, 1997).

A estimulação de anticorpos anti-TPI durante a infecção malárica sugere um papel importante desta enzima na patogénese da infecção, sendo expectável que a inibição da metabolização da glucose no eritrócito, por exemplo pela inibição ou parcial inibição da atividade da TPI, sem nenhum outro mecanismo para gerar ATP afete gravemente a proliferação parasitária.

A característica bioquímica mais notável na deficiência em TPI é a excessiva concentração celular de DHAP, observando-se um aumento de cerca de 30 a 40 vezes, comparado com os valores registados em indivíduos saudáveis (Orosz, *et al.*, 1996), tendo sido apontada como a principal causa de morbilidade nesta patologia (Ahmed, *et al.*, 2003). Baseando-se nesta característica, na depleção da GSH reduzida e no *stress*

oxidativo em indivíduos deficientes em TPI, Ahmed, *et al.* (2003) sugerem que a anormal acumulação de metilglioxal (MG) possa estar associada a esta deficiência.

O MG é um produto tóxico, mutagénico e um inibidor das enzimas glicolíticas. Em condições fisiológicas forma-se não enzimaticamente a partir dos trioses fosfato na glicólise, por uma reação irreversível de  $\beta$ -eliminação do grupo fosfato do 3-fosfato-1,2-enediol intermediário. Uma vez formado, o MG modifica irreversivelmente grupos amina em lípidos, ácidos nucleicos e proteínas formando produtos avançados de glicação (AGEs). O sistema dos glioxalases dependente do glutatíono é a principal via de eliminação deste composto convertendo-o em D-lactato e regenerando o glutatíono. A dependência do glutatíono como cofactor catalítico do sistema dos glioxalases é observada em todas as células eucariotas (**Figura IV.2**) (Quintas, *et al.*, 2008).



**FiguraVI.2: Formação, reatividade e destoxificação do metilglioxal em eritrócitos parasitados.** Tanto o eritrócito (E) como o *Plasmodium* sp. (P) necessitam da glucose proveniente da via glicolítica. Nesta via a conversão do fosfato de dihidroxiacetona a gliceraldeído 3-fosfato pela triosefosfato isomerase não é um processo perfeito. A eliminação do fosfato produz um intermediário 2-oxoaldeído reativo, o metilglioxal (MG) como um subproduto. Altamente electrofílico, este composto reage com ácidos nucleicos e proteínas, formando produtos avançados de glicação (AGEs). Assim, o MG e outros 2-oxoaldeídos podem tornar-se tóxicos e mutagénicos. Para evitar tais efeitos, o sistema dos glioxalases – que consiste na glutatona (GSH) e em duas enzimas glioxalase I (Glo1) e glioxalase II (Glo2) - converte os 2-oxoaldeídos tóxicos a 2-hidroxicarboxílicos não tóxicos, tais como o D-lactato. Devido ao elevado fluxo da via glicolítica em eritrócitos parasitados, a inibição do sistema de desintoxicação (cruzes cinzentas) resulta na acumulação de AGEs potencialmente letais (adaptado de Urscher, *et al.*, 2011).



O aumento da concentração de DHAP e o decréscimo celular de GSH reduzida são condições propícias à acumulação de MG. Ahmed, *et al.* (2003) investigaram o envolvimento do MG na deficiência em TPI. Estudaram dois irmãos húngaros deficientes em TPI, com genótipos idênticos: mutações Glu145Stop e Phe240Leu, mas com quadros clínicos distintos: ambos apresentavam anemia hemolítica, mas apenas um desenvolveu alterações neurológicas, tendo sido registada menor concentração eritrocitária de MG no paciente sem alterações neurológicas, comparada com a concentração de MG observada no irmão (com distúrbios neurológicos), sugerindo que a acumulação deste composto contribui diretamente para a patogénese da neurodegeneração na deficiência em TPI.

Pavlovic-Djuranovic, *et al.* (2006) testaram a permeabilidade de uma aquagliceroporina de *P. falciparum* (PfAQP), um canal bifuncional permeável à água e solutos, à passagem da dihidroxiacetona não fosforilada (DHA), uma triose facilmente metabolizada pela via glicolítica em eritrócitos humanos; e ao MG e avaliaram o efeito da incubação destes compostos em eritrócitos humanos infetados por *P. falciparum* Binh1 e *P. falciparum* 3D7 (estirpe sensível à cloroquina). Os resultados reportados neste estudo demonstram que DHA é tóxica para o parasita, apresentando um valor de IC<sub>50</sub> de 3,3mM para a estirpe Binh1 e de 2,6mM para a estirpe 3D7. O MG revelou ser um potente inibidor da proliferação parasitária observando-se um IC<sub>50</sub> de 223µM e 128µM para as estirpes Binh1 e 3D7, respetivamente. A componente citotóxica associada à DHA deve-se ao facto do genoma do *Plasmodium* sp. aparentemente não contemplar os mecanismos que possibilitam o processo de fosforilação da DHA (genes DHA quinase). Outra evidência que afirma a toxicidade deste composto é a sua capacidade de inibir a enzima GAPDH de *P. falciparum* (PfGAPDH) numa concentração de 2,5mM DHA. A inibição do GAPDH leva à acumulação de G3P, o que promove a formação espontânea de MG citotóxico.

A formação de MG, tóxica ao parasita e, em elevadas concentrações ao humano, parece estar associada a alterações na via glicolítica, fortemente relacionada com a perda da atividade enzimática da TPI, indicando uma possível via de atenuação do parasita associada à variante alélica -8A do promotor desta enzima.

## **V - CONCLUSÃO**

---

Este estudo centrou-se na análise do gene *TPI* na sua totalidade, e não apenas no promotor como os demais trabalhos anteriormente publicados, na população Africana e na relação das variadas alterações alélicas deste gene com a gravidade da infeção malárica.

Contudo, foi na região promotora do gene *TPI* que foi observado um maior número de polimorfismos, apresentando a alteração -8A diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ), entre indivíduos com infeção malárica grave e não-grave. Por outro lado, a antiguidade estimada para esta variação alélica é compatível com uma origem durante a difusão da malária nos humanos. Estes dados sugerem que esta mutação tem vindo a ser selecionada através da pressão de seleção atribuída à malária. Esta hipótese é também corroborada pelo cálculo do desequilíbrio de *linkage* entre os polimorfismos do promotor e os microssatélites analisados neste trabalho que são compatíveis com o modelo seletivo.

Os indivíduos que apresentam a alteração alélica -8A são clinicamente saudáveis, apesar de lhes ser associada uma redução da atividade enzimática da TPI eritrocitária. Esta constatação criou uma panóplia de hipóteses, associando a redução enzimática à forma não-grave da infeção malárica, ou seja, tentou-se explicar, a nível bioquímico, em que medidas a parcial inibição desta enzima contribui para a atenuação do *Plasmodium* sp., sendo sugerida a hipótese de formação e acumulação de MG citotóxico, um potente inibidor da proliferação parasitária, mesmo em concentrações reduzidas. A acumulação de MG citotóxico parece contribuir para a neurodegeneração reportada nos doentes deficientes em TPI.

É crucial compreender os mecanismos que o organismo humano utiliza para atenuar a infeção por *Plasmodium* sp., pois destes estudos poderão advir novos alvos para o desenvolvimento de novos fármacos antimaláricos.

Futuramente, seria interessante estudar, a nível celular e bioquímico, o que realmente se sucede nos eritrócitos de indivíduos mutados com o alelo -8A da região promotora da TPI, infetados por *Plasmodium* sp., analisando especialmente a atividade enzimática da TPI, a proliferação parasitária e a formação e acumulação de compostos como o MG, a DHA, a DHAP e o G3P.

Outra abordagem que, numa perspetiva futura, poderá ser relevante, é a continuidade do estudo imunológico iniciado por Ritter, *et al.* (1993), avaliando-se a razão pela qual a resposta humoral anti-TPI é desencadeada durante a infeção malárica.

## **VI - BIBLIOGRAFIA**

---

---

**Internet:**

- Base de dados *1000 Genomes Project* (busca ativa de SNPs) – [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000111669;r=12:6976283-6980112;t=ENST00000229270](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000111669;r=12:6976283-6980112;t=ENST00000229270); acedido a 13 de Março de 2012.
- Base de dados *Ensembl* (busca ativa de SNPs) – <http://www.ensembl.org/>; acedido a 13 de Março de 2012.
- Boletim Epidemiológico Nº 2/2011, Ministério da Saúde de Moçambique - [http://www.misau.gov.mz/pt/misau/dnsp\\_direccao\\_nacional\\_de\\_saude\\_publica/departamento\\_de\\_epidemiologia/boletins\\_trimestrais](http://www.misau.gov.mz/pt/misau/dnsp_direccao_nacional_de_saude_publica/departamento_de_epidemiologia/boletins_trimestrais); acedido a 25 de Fevereiro de 2012.
- Documento Estratégico para o Controlo da Malária em Moçambique, PNCM, Julho 2006-2009 - [www.usaid.gov/mz/doc/plan/mds\\_pncm\\_strat%202006-09.pdf](http://www.usaid.gov/mz/doc/plan/mds_pncm_strat%202006-09.pdf); acedido a 25 de Fevereiro de 2012.
- Excoffier, L. & Schneider, S. (2005) - Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50 - <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>, acedido a 9 de Março de 2012
- Guide to Surveillance, Reporting and Control, 2006 - Massachusetts Department of Public Health, Bureau of Communicable Disease Control, Malaria - <http://www.mass.gov/eohhs/docs/dph/disease-reporting/guide/malaria.pdf>; acedido a 4 de Setembro de 2012.
- MedCalc para Windows, versão 12.3.0, *MedCalc Software* - <http://www.medcalc.org/index.php>; acedido a 20 de Maio de 2012.
- Ministério da Saúde de Moçambique - <http://www.misau.gov.mz>; acedido a 25 de Fevereiro de 2012.

- 
- Perfil Estatístico do Município de Maputo, 2007-2008 – [www.cmmaputo.gov.mz/](http://www.cmmaputo.gov.mz/); acedido a 25 de Fevereiro de 2012.
  
  - Portal do Governo de Moçambique - <http://www.portaldogoverno.gov.mz/Mozambique>; acedido a 25 de Fevereiro de 2012.
  
  - Rozen, S. & Skaletsky, H. (2000) - Primer3 v.0,4,0. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Krawetz, S. & Misener, S. (Eds), Humana Press, Totowa, 365-386 - <http://frodo.wi.mit.edu/>; acedido a 23 de Fevereiro de 2012.
  
  - WHO (2007) - *World Health Organization* - [http://www.searo.who.int/en/Section10/Section21/Section342\\_1028.htm](http://www.searo.who.int/en/Section10/Section21/Section342_1028.htm); acedido a 24 de Agosto, 2012.
  
  - WHO (2008) – Global malaria control and elimination: report of a technical review, *World Health Organization* - <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241596756/en/index.html>, acedido a 10 de Agosto de 2012.
  
  - WHO (2011) – *World Malaria Report 2011*, *World Health Organization* - [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2011/en/](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/); acedido a 25 de Fevereiro de 2012.
  
  - WHO (2012) – *World Health Organization* - [http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/map\\_2266.pdf](http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/map_2266.pdf); acedido a 29 de Julho de 2012.
  
  - Uitenbroek, D. (1997) – SISA Binomial - <http://www.quantitativeskills.com/sisa/distributions/binomial.htm>; acedido a 15 de Maio de 2012.

---

**Literatura:**

Ahmed, N., Battah, S., Karachalias, N., Babaei-Jadidi, R., Horányi, M., Baróti, K., Hollan, S. & Thornalley, P. (2003) – Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1639: 121-132.

Armelagos, G., Barnes, K. & Lin, J. (1996) – Disease in human evolution: the re-emergence of infectious disease in the third epidemiological transition. *National Museum of Natural History*, 18: 1-6.

Arya, R., Lalloz, M., Bellingham, A. & Layton, D. (1995) – Molecular pathology of human triosephosphate isomerase. *Blood*, 86 (supplement I): 585a.

Arya, R., Lalloz, M., Bellingham, A. & Layton, D. (1997) – Evidence for founder effect of the Glu104Asp substitution and identification of new mutations in triosephosphate isomerase deficiency. *Human Mutation*, 10: 290-294.

Ayi, K., Min-Oo, G., Serghides, L., Crockett, M., Kirby-Allen, M., Quirt, I., Gros, P. & Kain, K. (2008) – Pyruvate kinase deficiency and malaria. *New England Journal of Medicine*, 358: 1805-1810.

Bartoloni, A. & Zammarchi, L. (2012) – Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4.

Boyer, T. & Maquat, L. (1990) – Minimal sequence and factor requirements for the initiation of transcription from an atypical, TATATAA box-containing housekeeping promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 20524-20532.

Bronner, U., Divis, P., Färnert, A. & Singh, B. (2009) – Swedish traveller with *Plasmodium knowlesi* malaria after visiting Malaysian Borneo. *Malaria Journal*, 8: 1-5.



Brown, J., Daar, I., Krug, J. & Maquat, L. (1985) – Characterization of the functional gene and several processed pseudogenes in the human triosephosphate isomerase gene family. *Molecular and Cellular Biology*, 5: 1694-1706.

Bottius, E., Guanzirolli, A., Trape, J., Rogier, C., Konate, L. & Druilhe, P. (1996) – Malaria: even more chronic in nature than previously thought; evidence for subpatent parasitaemia detectable by the polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90: 15-19.

Çakir, T., Tacer, C. & Ulgen, K. (2004) – Metabolic pathway analysis of enzyme-deficient human red blood cells. *Biosystems*, 78: 49-67.

Cappadoro, M., Giribaldi, G., O'Brien, E., Turrini, F., Mannu, F., Ulliers, D., Simula, G., Luzzatto, L. & Arese, P. (1998) – Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by *Plasmodium falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood*, 92: 2527-2534.

Cappellini, M. & Fiorelli, G. (2008) – Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *The Lancet*, 371: 64-74.

Carter, R. & Mendis, K. (2002) – Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 564-594.

Chang, M., Artymiuk, P., Wu, X., Hollán, S., Lammi, A. & Maquat, L. (1993) – Human triosephosphate isomerase deficiency resulting from mutation of Phe-240. *American Journal of Human Genetics*, 52: 1260-1269.

Chiodini, P., Moody, A. & Manser, D. (2001) – Malaria parasites. In: *Atlas of Medical Helminthology and Protozoology*. 4<sup>th</sup> Edition, Churchill Livingstone, London, 61-70.

Cholera, R., Brittain, N., Gillrie, M., Lopera-Mesa, T., Diakité, S., Arie, T., Krause, M. Guindo, A., Tubman, A., Fujioka, H., Diallo, D., Doumbo, O., Ho, M., Wellems, T. &

Fairhurst, R. (2008) – Impaired cytoadherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes containing sickle haemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 991-996.

Christofk, H., Vander Heiden, M., Harris, M., Ramanathan, A., Gerszten, R., Wei, R., Fleming, M., Schreiber, S. & Cantley, L. (2008) – The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452: 230-233.

Craig, B., Pirtle, I., Gracy, R. & Pirtle, R. (2001) – Characterisation of the transcription unit and two processed pseudogenes of chimpanzee triosephosphate isomerase. *Gene*, 99: 217-227.

Daar, I., Artymiuk, P., Phillips, D. & Maquat, L. (1986) – Human triose-phosphate isomerase deficiency: a single amino acid substitution results in a thermolabile enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 83: 7903-7907

Daar, I. & Maquat, L. (1988) – Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 8: 802-813.

Despommier, D., Gwadz, R., Hotez, P. & Knirsch, C. (2005) – The Malaria. In: *Parasitic Diseases*. 5<sup>th</sup> Edition, Apple Trees Productions, New York, 50-68.

Dhangadamajhi, G., Kar, S. & Ranjit, M. (2010) – The Survival Strategies of Malaria Parasite in the Red Blood Cell and Host Cell Polymorphisms. *Malaria Research and Treatment*, 973094.

Durand, P. & Coetzer, T. (2008) – Pyruvate kinase deficiency protects against malaria in humans. *Haematologica*, 93: 939-940.

Fairhurst, R., Baruch, D., Brittain, N., Ostera, G., Wallach, J., Hoang, H., Hayton, K., Guindo, A., Makobongo, M., Schwartz, O., Tounkara, A., Doumbo, O., Diallo, D.,

- Fujioka, H., Ho, M. & Wellems, T. (2005) – Abnormal display of PfEMP-1 on erythrocytes carrying haemoglobin C may protect against malaria. *Nature*, 435: 1117-1121.
- Fry, A., Griffiths, M., Auburn, S., Diakite, M., Forton, J., Green, A., Richardson, A., Wilson, J., Jallow, M., Sisay-Joof, F., Pinder, M., Peshu, N., Williams, T., Marsh, K., Molyneux, M., Taylor, T., Rockett, K. & Kwiatkowski D. (2008) – Common variation in the ABO glycosyltransferase is associated with susceptibility to severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Human Molecular Genetics*, 17: 567-576.
- Gero, A. & Kirk, K. (1994) – Nutrient transport pathways in *Plasmodium*-infected erythrocytes: what and where are they? *Parasitology Today*, 10: 395-399.
- Guindo, A., Fairhurst, R., Doumbo, O., Wellems, T. & Diallo, D. (2007) – X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Medicine*, 4: e66.
- Guo, S. & Thompson, E. (1992) – Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48 :361-372.
- Hedrick, P. (2011) – Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity*, 107: 283-304.
- Humphries, A., Ationu, A., Lalloz, M. & Layton, D. (1999) – Ancestral origin of variation in the triosephosphate isomerase gene promoter. *Human Genetics*, 104: 486-491.
- Humphries, A., Ationu, A., Wild, B. & Layton, D. (1999b) – The consequence of nucleotide substitutions in the triosephosphate isomerase (TPI) gene promoter. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 25: 210-217.

Jacobasch, G. & Rapoport, S. (1996) – Hemolytic anemias due to erythrocyte enzyme deficiencies. *Molecular Aspects of Medicine*, 17: 143-170.

Johnson, M., Clark, T., Njama-Meya, D., Rosenthal, P. & Parikh, S. (2009) - Impact of the method of G6PD deficiency assessment on genetic association studies of malaria susceptibility. *PLoS One*, 4: e7246.

Kantele, A. & Jokiranta, T. (2011) – Review of Cases With the Emerging Fifth Human Malaria Parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Emerging infections*, 52: 1356-1362.

Kirkwood, B. (1988) – *The Essentials of Medical Statistics*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Laishram, D., Sutton, P., Nanda, N., Sharma, V., Sobti, R., Carlton, J. & Joshi, H. (2012) – The complexities of malaria disease manifestations with a focus on asymptomatic malaria. *Malaria Journal*, 11: 1-15.

Leslie, T., Briceño, M., Mayan, I., Mohammed, N., Klinkenberg, E., Sibley, C., Whitty, C. & Rowland, M. (2010) – The impact of phenotypic and genotypic G6PD deficiency on risk of *Plasmodium vivax* infection: a case-control study amongst Afghan refugees in Pakistan. *PLoS Medicine*, 7: e1000283.

Machado, P., Mendes, C., do Rosário, V. & Arez, A. (2010) – A contribuição dos polimorfismos humanos do eritrócito na proteção contra a malária. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1: 85-96.

Machado, P., Pereira, R., Rocha, A., Manco, L., Fernandes, N., Miranda, J., Ribeiro, L., do Rosário, V., Amorim, A., Gusmão, L. & Arez, A. (2010) – Malaria: looking for selection signatures in the human PKLR gene region. *British Journal of Haematology*, 149: 775-784.

Machado, P., Manco, L., Gomes, C., Mendes, C., Fernandes, N., Salomé, G., Siteo, L., Chibute, S., Langa, J., Ribeiro, L., Miranda, J., Cano, J., Pinto, J., Amorim, A., do Rosário, V. & Arez, A. – Pyruvate kinase deficiency in sub-Saharan Africa: identification of a highly frequent missense mutation (G829A;Glu277Lys) and association with malaria. *PLoS ONE*. In Press.

Maier, A., Duraisingh, M., Reeder, J., Patel, S., Kazura, J., Zimmerman, P. & Cowman, A. (2003) – *Plasmodium falciparum* erythrocyte invasion through glycophorin C and selection for Gerbich negativity in human populations. *Nature Medicine*, 9: 87-92.

Manco, L., Oliveira, A., Gomes, C., Granjo, A., Trovoadá, M., Ribeiro, M., Abade, A. & Amorim, A. (2001) – Population genetics of four PKLR intragenic polymorphisms in Portugal and São Tomé e Príncipe (Gulf of Guinea). *Human Biology*, 73: 467-474.

Manco, L. & Ribeiro, M. (2007) – Novel human pathological mutations. Gene symbol: TPI1. Disease: triosephosphate isomerase deficiency. *Human Genetics*, 121: 650.

Manco, L., Machado, P., Lopes, D., Nogueira, F., Do Rosário, V., Alonso, P., Varandas, L., Trovoadá, M., Amorim, A. & Arez, A. (2009) – Analysis of TPI gene promoter variation in three sub-Saharan Africa population samples. *American Journal of Human Biology*, 21: 118-120.

Maquat, L., Chilcote, R. & Ryan, P. (1985) – Human triosephosphate isomerase cDNA and protein structure. Studies of triosephosphate isomerase deficiency in man. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 3748-3753.

Marques, P., Saúte, F., Pinto, V., Cardoso, S., Pinto, J., Alonso, P., do Rosário, V. & Arez, A. (2005) – *Plasmodium* species mixed infections in two ecologically diferente áreas of Manhica district, Mozambique. *International Journal of Biological Sciences*, 1: 96-102.

- 
- Mendis, K., Rietveld, A., Warsame, M., Bosman, A., Greenwood, B. & Wernsdorfer, W. (2009) – From malaria control to eradication: The WHO Perspective. *Tropical Medicine and International Health*, 14: 1-7.
- Mendis, K., Sina, B., Marchesini, P. & Carter, R. (2001) – The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 64: 97-105.
- Miller, L., Baruch, D., Marsh, K. & Doumbo, O. (2002) – The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 415: 673-679.
- Min-Oo, G., Fortin, A., Tam, M., Nantel, A., Stevenson, M. & Gros, P. (2003) – Pyruvate kinase deficiency in mice protects against malaria. *Nature Genetics*, 35: 357-362.
- Min-Oo, G. & Gros, P. (2005) – Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect. *Cellular Microbiology*, 7: 753-763.
- Mohandas, N. & Gallagher, P. (2008) – Red cell membrane: past, present, and future. *Blood*, 112: 3939-3948.
- Mohrenweiser, H. & Fielek, S. (1982) – Elevated frequency of carriers for triosephosphate isomerase deficiency in newborn infants. *Pediatric Research*, 16: 960-963.
- Neubauer, B., Pekrun, A., Eber, S., Lakomek, M. & Schroeter, W. (1992) – Relation between genetic defect, altered protein structure, and enzyme function in triose-phosphate isomerase (TPI) deficiency. *European Journal of Pediatrics*, 151: 232
- Neves, D., Melo, A., Linardi, P. & Vitor, R. (Eds.) (2005) – *Parasitologia Humana*. 11<sup>a</sup> Edição, Atheneu, São Paulo, 143-161.

Nkhoma, E., Poole, C., Vannappagari, V., Hall, S. & Beutler, E. (2009) – The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 42: 267-278.

Oka, T., Ouchida, M., Koyama, M., Ogama, Y., Takada, S., Nakatani, Y., Tanaka, T., Yoshino, T., Hayashi, K., Ohara, N., Kondo, E., Takahashi, K., Tsuchiyama, J., Tanimoto, M., Shimizu, K. & Akagi, T. (2002) – Gene Silencing of the Tyrosine Phosphatase SHP1 Gene by Aberrant Methylation in Leukemias/Lymphomas. *Cancer Research*, 62: 6390-6394.

Olivieri, N., Muraca, G., O'Donnell, A., Premawardhena, A., Fisher, C. & Weatherall, D. (2008) – Studies in haemoglobin E beta-thalassaemia. *British Journal of Haematology*, 141: 388-397.

Orita, M., Iwahana, H., Kanazawat, H., Hayashi, K. & Sekiya, T. (1989) – Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86: 2766-2770.

Orosz, F., Oláh, J. & Ovádi, J. (2009) – Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792: 1168-1174.

Orosz, F., Vértessy, B., Hollán, S., Horányi, S., Ovádi, J. (1996) – Triosephosphate isomerase deficiency: predictions and facts. *Journal of Theoretical Biology*, 182: 437-447.

Palek, J., Lui, S. & Snyder, L. (1978) – Metabolic dependence of protein arrangement in human erythrocyte membranes. Analysis of spectrin rich complexes in ATP-depleted cells. *Blood*, 51: 385-395.

Pavlovic-Djuranovic, S., Kun, J., Schultz, J. & Beitz, E. (2006) – Dihydroxyacetone and methylglyoxal as permeants of the Plasmodium aquaglyceroporin inhibit parasite proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758: 1012-1017.

Perry, B. & Mohrenweiser, H. (1992) – Human triosephosphate isomerase: substitution of Arg for Gly at position 122 in a thermolabile electromorph variant, TPI-Manchester. *Human Genetics*, 88: 634-638.

Quintas, A., Freire, A., Halpern, M. (Eds.) (2008) – *Bioquímica, organização molecular da vida*. Lidel, Lisboa, 333-354.

Ritter, K., Kuhlencord, A., Tomssen, R. & Bommer, W. (1993) – Prolonged haemolytic anemia in malaria and autoantibodies against triosephosphate isomerase. *Lancet*, 342: 1333-1334.

Roth, E., Raventos-Suarez, C., Rinaldi, A. & Nagel, R. (1983) – Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80: 298-299.

Ruwende, C., Khoo, S., Snow, R., Yates, S., Kwiatkowski, D., Gupta, S., Warn, P., Allsopp, C., Gilbert, S., Peschu, N., Newbold, C., Greenwood, B., Marsh, K. & Hill, A. (1995) – Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature*, 376: 246-249.

Schneider, A. (2000) – Triosephosphate isomerase deficiency: historical perspectives and molecular aspects. *Baillieres Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13: 119-140.

Schneider, A. & Cohen-Solal, M., (1996) – Hematologically important mutations: triosephosphate isomerase. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 22: 82-84.

Schneider, A., Forman, L., Westwood, B., Yim, C., Lin, J., Singh, S. & Beutler, E. (1998) – The relationship of the -5, -8, and -24 variant alleles in African Americans to triosephosphate isomerase (TPI) enzyme activity and to TPI deficiency. *Blood*, 92: 2959-2962.



Schneider, A., Westwood, B., Yim, C., Prchal, J., Berkow, R., Labotka, R., Warrier, R. & Beutler, E. (1995) – Triosephosphate Isomerase Deficiency: Repetitive Occurrence of Point Mutation in Amino Acid 104 in Multiple Apparently Unrelated Families. *American Journal of Hematology*, 50: 263-268.

Schneider, A., Valentine, W., Hattori, M. & Heins, H. (1965) – Hereditary hemolytic anemia with triosephosphate isomerase deficiency. *New England Journal of Medicine*, 272: 229-235.

Scotto, G. (2010) – [Malaria: an update]. *Le Infezioni in Medicina*, 18: 213-234.

Seixas, S., Garcia, O., Trovada, M., Santos, M., Amorim, A. & Rocha, J. (2001) – Patterns of haplotype diversity within the serpin gene cluster at 14q32.1: insights into the natural history of the alpha1-antitrypsin polymorphism. *Human Genetics*, 108: 20-30.

Shiozawa, M., Fukutani, Y., Arai, N., Cairns, N., Mizutani, T., Isaki, K., Lantos, P. & Wada, Y. (2003) – Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and endothelin-1 immunoreactivity is associated with cerebral white matter damage in dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Neuropathology*, 23: 36-43.

Slatkin, M. & Excoffier, L. (1996) – Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity*, 76: 377-383.

Sokal, R. & Rohlf, F. (1981) – *Biometry*. 2<sup>nd</sup> Edition. W. H. Freeman and Company, San Francisco, 859.

Snounou, G., Viriyakosol, S., Jarra, W., Thaithong, S. & Brown, K. (1993) – Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of high prevalence of mixed infections. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58: 283-292.

- Stoute, J. (2005) – Complement-regulatory proteins in severe malaria: too little or too much of a good thing. *Trends in Parasitology*, 21: 218-223.
- Subbayya, I., Ray, S., Balaram, P. & Balaram, H. (1997) – Metabolic enzymes as potential drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Indian Journal of Medical Research*, 106: 79-94.
- Uneke, C. (2011) – Congenital malaria: an overview. *Tanzania Journal of Health Research*, 13.
- Uneke, C. (2009) – Deforestation and Malaria in sub-Saharan Africa: an overview. *The Internet Journal of Tropical Medicine*, 6.
- Urscher, M., Alisch, R. & Deponter, M. (2011) – The glyoxalase system of malaria parasites – Implications for cell biology and general glyoxalase research. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 22: 262-270.
- Valentin, C., Pissard, S., Martin, J., Heron, D., Labrune, P., Livet, M., Mayer, M., Gelbart, T., Schneider, A., Max-Audit, I. & Cohen-Solal, M. (2000) – Triose phosphate isomerase deficiency in 3 French families: two novel null alleles, a frameshift mutation (TPI Alfortville) and an alteration in the initiation codon (TPI Paris). *Blood*, 96: 1130-1135.
- Watanabe, M., Zingg, B. & Mohrenweiser, H. (1996) – Molecular analysis of a series of alleles in humans with reduced activity at the triosephosphate isomerase locus. *American Journal of Human Genetics*, 58: 308-316.
- Wellems, T., Hayton, K. & Fairhurst, R. (2009) – The impact of malaria parasitism: from corpuscles to communities. *Journal of Clinical Investigation*, 119: 2496-2505.
- WHO (2000) – Severe *falciparum* malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94: 1-90.

Williams, T. (2006) – Red blood cell defects and malaria. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149: 121-127.

Yamada, M. (2010) – Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Neuropathology*, 30: 453-457.

Zanella, A., Bianchi, P. & Fermo, E. (2007) – Pyruvate kinase deficiency. *Haematologica*, 92: 721-723.

Zwerschke, W., Mazurek, S., Stöckl, P., Hütter, E., Eigenbrodt, E. & Jansen-Dürr, P. (2003) – Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *The Biochemical Journal*, 376: 403-411.